

**JULIANA FERREIRA DE MOURA**

**DESENVOLVIMENTO DE ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO  
PARA DETERMINAÇÃO DO HORMÔNIO  
DO CRESCIMENTO HUMANO**

Dissertação apresentada como requisito parcial à  
obtenção do grau de Mestre em Ciências  
Farmacêuticas, Curso de Pós-Graduação em  
Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da  
Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Bonald C. de Figueiredo  
Co-orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Vânia M. de Alcântara

**CURITIBA  
2001**

Título: **Mestre em Ciências Ciências Farmacêuticas**  
**Área de Análises Clínicas**

Dissertação: **Desenvolvimento de ensaio imunoenzimático para determinação do hormônio do crescimento humano.**

Candidata: **JULIANA FERREIRA DE MOURA**

Banca Examinadora: Prof. Dr. Bonald Cavalcante Figueiredo (Orientador /UFPR)  
Prof. Dr. Mário Hiroyuki Hirata (USP- São Paulo)  
Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol (UFPR)

**Parecer:** A Comissão Examinadora reunida nesta data, nas dependências do Setor de Ciências da Saúde, sede Botânico, da Universidade Federal do Paraná, após exame e julgamento da dissertação, atribui as seguintes notas: Prof. Dr. Bonald Cavalcante Figueiredo: Nota: 10,0; Prof. Dr. Mário Hiroyuki Hirata: Nota: 10,0, Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol : Nota: 10,0...; é de parecer que constitui um trabalho científico e recomenda a sua publicação após as correções sugeridas.

**APROVA A DISSERTAÇÃO COM A NOTA: 10,0 e CONCEITO: A...**

A candidata tem 60 (sessenta) dias para as correções propostas pela Comissão, para que se possa dar continuidade ao processo.

Curitiba, 28 de novembro de 2001.

Prof. Dr Bonald Cavalcante Figueiredo

Prof. Dr. Mário Hiroyuki Hirata

Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol

Ciente candidata:

*Aos meus pais Umberto e Nilda pela eterna dedicação.*  
*Aos meus irmãos Nando e Cris pelo carinho e incentivo.*  
*Ao Michel, co-autor da história da minha vida...*

## AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Bonald C. Figueiredo pelo incentivo à pesquisa e pela orientação desta dissertação;

À professora Dra. Vânia Manfredini de Alcântara pela dedicação e co-orientação deste trabalho;

Ao professor Cid Aimbiré Moraes dos Santos, Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas e a todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente pelo reconhecimento deste curso de pós-graduação;

A todos os professores do curso de graduação em Farmácia e Bioquímica e da pós-graduação em Ciências Farmacêuticas;

Aos veterinários do CPPI, Sandra Sella e João Minoso pelas imunizações;

Ao Prof. Dr. Carlos Chàvez-Olórtegui, ao Prof. Dr. Sílvio Sanches, ao Prof. Dr. Luiz Juliano e ao Prof. Dr. Luís Calfe pela colaboração;

Às enfermeiras Leo, Dirce, Tere e Mariângela, pela amizade e pela cooperação;

À bióloga e amiga Elis pela amizade, dedicação e incentivo;

Às amigas Fernanda, Sandra e Denise pela contribuição;

Aos médicos e às amigas da Unidade de Endocrinologia Pediátrica, Verinha, Neusa, Marli, Anita, Lilian, D. Alice, pelo afeto;

Às farmacêuticas-bioquímicas do Laboratório de Medicina Nuclear, Gislaine e Flávia, pelo auxílio;

Aos farmacêuticos-bioquímicos do Laboratório Frischmann Aisengart Murilo e Elvira pela cooperação.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE QUADROS .....</b>	<b>vii</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>vii</b>
<b>LISTA DE EQUAÇÕES .....</b>	<b>vii</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>viii</b>
<b>LISTA DE GRÁFICOS .....</b>	<b>viii</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....</b>	<b>ix</b>
<b>LISTA DE MATERIAIS UTILIZADOS .....</b>	<b>x</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>xi</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>xii</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>2</b>
2.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS IMUNOENSAIOS .....	2
2.2 HORMÔNIO DO CRESCIMENTO HUMANO .....	6
2.2.1 Heterogeneidade: genes e isoformas .....	6
2.2.2 Interação com o receptor somatogênico .....	8
2.2.3 Principais atividades biológicas .....	10
2.2.4 Analogia estrutural e funcional com a prolactina .....	11
2.3 QUANTIFICAÇÃO DO HORMÔNIO DO CRESCIMENTO .....	15
2.3.1 Diagnóstico de deficiência de hGH .....	15
2.3.2 Variações analíticas dos ensaios .....	16
2.3.3 Novos ensaios: uma tentativa de otimizar diagnósticos .....	17
2.3.3.1 Caracterização dos epítomos do hGH em relação à bioatividade .....	19
2.4 DESENVOLVIMENTO DO ELISA SANDUÍCHE .....	21
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>24</b>
3.1 OBJETIVO GERAL .....	24
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	24
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>25</b>
4.1 OBTENÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS ANTI-rhGH .....	25
4.1.1 Seleção do animal a ser imunizado .....	25
4.1.2 Imunização do animal .....	25
4.1.3 Antígeno .....	25
4.1.4 Confirmação da imunização .....	26
4.1.4.1 Imunodifusão .....	26
4.1.4.2 ELISA indireto .....	28
4.1.5 Extração de imunoglobulinas .....	30
4.2 PURIFICAÇÃO DAS IMUNOGLOBULINAS .....	31
4.2.1 Colunas de afinidade .....	31
4.2.2 Percentual de ligação .....	33
4.2.3 Purificação de anticorpos anti-rhGH .....	34
4.2.4 Purificação de anticorpos anti-sítio 1 .....	35
4.3 CONJUGAÇÃO DOS ANTICORPOS À <i>HORSERADISH PEROXIDASE</i> .....	36
4.4 PADRONIZAÇÃO DO ELISA SANDUÍCHE .....	39
4.5 AMOSTRAS .....	42
4.5.1 Soro dos pacientes .....	42
4.5.2 <i>Pool</i> de soros .....	42
4.6 CARACTERÍSTICAS DO ENSAIO .....	43
4.6.1 Determinação da faixa de linearidade .....	43
4.6.2 Determinação da sensibilidade .....	43
4.6.3 Precisão .....	44
4.6.4 Exatidão .....	44

4.6.4.1	Recuperação.....	44
4.6.4.2	Cálculos da recuperação .....	45
4.6.4.3	Linearidade do soro .....	46
4.6.5	Especificidade .....	46
4.7	APLICAÇÃO DO ELISA SANDUÍCHE ANTI-HÉLICE 4.....	47
4.7.1	Padronização do volume de soro.....	47
4.7.2	Otimização do tempo de execução .....	48
4.7.3	Quantificação do hGH sérico de crianças .....	49
4.8	COMPARAÇÕES ENTRE OS ENSAIOS .....	50
4.8.1	Características do IRMA .....	51
4.8.2	Características do ICMA .....	52
4.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	53
5	<b>RESULTADOS</b> .....	54
5.1	OBTENÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS ANTI-rhGH .....	54
5.1.1	Confirmação da imunização .....	54
5.1.1.1	Imunodifusão .....	54
5.1.1.2	ELISA indireto.....	54
5.2	PURIFICAÇÃO DOS ANTICORPOS.....	55
5.2.1	Síntese dos peptídeos .....	55
5.2.2	Colunas de afinidade .....	55
5.2.2.1	Percentual de ligação do rhGH e dos peptídeos sintéticos à <i>Sepharose</i> <sup>®</sup> .....	55
5.2.2.2	Quantificação das imunoglobulinas.....	55
5.3	PADRONIZAÇÃO DO ELISA SANDUÍCHE.....	56
5.3.1	ELISA sanduíche.....	56
5.4	CARACTERÍSTICAS DO ENSAIO.....	57
5.4.1	Determinação da faixa de linearidade .....	57
5.4.2	Determinação da sensibilidade do ELISA .....	59
5.4.3	Precisão .....	59
5.4.4	Exatidão.....	60
5.4.4.1	Recuperação.....	60
5.4.4.2	Linearidade .....	60
5.4.5	Especificidade .....	62
5.5	DETERMINAÇÃO DE hGH ATRAVÉS DO ELISA SANDUÍCHE.....	63
5.5.1	Padronização do volume de soro humano .....	63
5.5.2	Aplicação do ELISA sanduíche na quantificação de hGH .....	63
5.6	COMPARAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS OBTIDOS COM O ELISA SANDUÍCHE E COM O IRMA.....	64
5.6.1	Avaliação dos resultados discrepantes através do ICMA .....	69
6	<b>DISCUSSÃO</b> .....	72
7	<b>CONCLUSÕES</b> .....	81
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	82
	<b>APÊNDICES</b> .....	96
	<b>ANEXO</b> .....	102

## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1	CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS IMUNOENSAIOS .....	5
QUADRO 2	VANTAGENS E DESVANTAGENS DOS IMUNOENSAIOS ENZIMÁTICOS .....	6
QUADRO 3	PERCENTAGEM DE AMINOÁCIDOS DIFERENTES ENTRE OS GHs DE MAMÍFEROS.....	22
QUADRO 4	DEMONSTRAÇÃO DOS DADOS DA RECUPERAÇÃO .....	45

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	MOLÉCULA TRIDIMENSIONAL DO hGH .....	9
FIGURA 2	LOCALIZAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS SELECIONADAS EM RELAÇÃO ÀS PONTES DISSULFETO .....	12
FIGURA 3	COMPARAÇÃO ENTRE AS SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS QUE COMPÕEM O SÍTIO 1 DE LIGAÇÃO DO hGH AO SEU RECEPTOR COM AS SEQUÊNCIAS CORRESPONDENTES PERTENCENTES À PROLACTINA HUMANA (hPRL).....	14
FIGURA 4	MAPEAMENTO DOS EPÍTOPOS DO hGH .....	19
FIGURA 5	COMPARAÇÃO ENTRE AS SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS CONSTITUINTES DO SÍTIO 1 DO hGH E AS SEQUÊNCIAS CORRESPONDENTES AO GH EQUINO.....	23
FIGURA 6	DILUIÇÃO DO SORO EQUINO PRÉ E PÓS-IMUNIZAÇÃO .....	27
FIGURA 7	COLUNA DE AFINIDADE PARA PURIFICAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-rhGH .....	34
FIGURA 8	COLUNA DE AFINIDADE PARA PURIFICAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-SÍTIO-1 .....	35
FIGURA 9	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO ELISA SANDUÍCHE.....	41
FIGURA 10	PADRONIZAÇÃO DO ELISA SANDUÍCHE .....	57
FIGURA 11	DILUIÇÃO SERIADA DA CURVA PADRÃO .....	58
FIGURA 12	ESPECIFICIDADE DO ANTICORPO ANTI-HÉLICE 4 .....	62
FIGURA 13	ELISA SANDUÍCHE ANTI-HÉLICE 4 PARA A DETERMINAÇÃO DO hGH EM PACIENTES SUBMETIDOS AO TESTE DE ESTÍMULO DA CLONIDINA .....	64

## LISTA DE EQUAÇÕES

EQUAÇÃO 1	CÁLCULO DO VOLUME DO PADRÃO A SER ADICIONADO .....	45
EQUAÇÃO 2	CÁLCULO DA CONCENTRAÇÃO RECUPERADA .....	45
EQUAÇÃO 3	CÁLCULO DA PORCENTAGEM RECUPERADA .....	46

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1	SENSIBILIDADE DO ELISA SANDUÍCHE .....	59
TABELA 2	COEFICIENTES DE VARIAÇÃO INTRA E INTERENSAIO.....	59
TABELA 3	RECUPERAÇÃO DO rhGH ADICIONADO AO SORO HUMANO .....	60
TABELA 4	LINEARIDADE APÓS DILUIÇÃO COM SORO DE OVELHA .....	61
TABELA 5	COMPARAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS OBTIDOS COM O ELISA, ICMA E IRMA .....	69

## LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1	FAIXA DE LINEARIDADE DO ELISA SANDUÍCHE .....	58
GRÁFICO 2	RESULTADOS OBTIDOS COM A DILUIÇÃO DOS SOROS COM SORO DE OVELHA .....	61
GRÁFICO 3	ESPECIFICIDADE DO ANTICORPO ANTI-HÉLICE 4 .....	62
GRÁFICO 4	CORRELAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS OBTIDOS COM O ELISA SANDUÍCHE E COM O IRMA EM SORO BASAL DE MENINOS .....	65
GRÁFICO 5	CORRELAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS OBTIDOS COM O ELISA SANDUÍCHE E COM O IRMA EM SORO BASAL DE MENINAS .....	65
GRÁFICO 6	CORRELAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS OBTIDOS COM O ELISA SANDUÍCHE E COM O IRMA EM SORO 60' DE MENINOS.....	65
GRÁFICO 7	CORRELAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS OBTIDOS COM O ELISA SANDUÍCHE E COM O IRMA EM SORO 60' DE MENINAS.....	66
GRÁFICO 8	CORRELAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS OBTIDOS COM O ELISA SANDUÍCHE E COM O IRMA EM SORO 90' DE MENINOS.....	67
GRÁFICO 9	CORRELAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS OBTIDOS COM O ELISA SANDUÍCHE E COM O IRMA EM SORO 90' DE MENINAS.....	67
GRÁFICO 10	CORRELAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS OBTIDOS COM O ELISA SANDUÍCHE E COM O IRMA EM SORO 120' DE MENINOS.....	68
GRÁFICO 11	CORRELAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS OBTIDOS COM O ELISA SANDUÍCHE E COM O IRMA EM SORO 120' DE MENINAS.....	68
GRÁFICO 12	CORRELAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS OBTIDOS COM O ELISA SANDUÍCHE E COM O IRMA.....	70
GRÁFICO 13	CORRELAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS OBTIDOS COM O ELISA SANDUÍCHE E COM O ICMA.....	70
GRÁFICO 14	CORRELAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS OBTIDOS COM O IRMA E COM O ICMA .....	71



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	- Absorbância
aa	- Aminoácidos
Ag	- Antígeno
CPPI	- Centro de Pesquisa e Produção de Imunobiológicos
CS	- Somatomamotropina coriônica
CV	- Coeficiente de variação
eGH	- GH eqüino
ELISA	- Ensaio imunoenzimático
ESTA	- Ensaio de coloração eluída
GHD	- Deficiência de hormônio do crescimento
GH	- Hormônio do crescimento
GHBP	- Proteína ligadora do GH
GHRH	- Hormônio liberador do GH
hGH	- Hormônio do crescimento humano
hGHR	- Receptor de GH humano
HP	- <i>Horseradish Peroxidase</i>
HPRL	- Prolactina humana
ICMA	- Ensaio imunoquimioluminométrico
IFA	- Ensaio imunofuncional
IFMA	- Ensaio imunofluorométrico
IGFBP-3	- Proteína ligadora do IGF-1
IGF-1	- Fator de crescimento insulina similar
IgG	- Imunoglobulina G
IRMA	- Ensaio imunorradiométrico
IRS	- Substrato do receptor de insulina
JAK 2	- Tirosina quinase <i>Janus 2</i>
OPD	- orto-fenilenodiamina
PBS	- Tampão fosfato
PL	- Hormônio lactogênico placentário
PRL	- Prolactina
PRLR	- Receptor de PRL
rhGH	- Hormônio do crescimento recombinante
RIA	- Radioimunoensaio
rpm	- Rotações por minuto
STAT	- Fator de transdução de sinal e de ativação da transcrição
TI	- Tampão de incubação

## LISTA DE MATERIAIS UTILIZADOS

Adjuvante completo de Freund	-	<i>Sigma F-5881</i>
Adjuvante incompleto de Freund	-	<i>Sigma F-5506</i>
Agar	-	<i>Sigma A-6549</i>
<i>Horseradish Peroxidase</i>	-	<i>Sigma P-6582</i>
Membrana de celulose	-	<i>Sigma D-9777</i>
Placa de poliestireno	-	<i>NUNC-MaxiSorp</i>
Polietilenoglicol	—	<i>Sigma P-2263</i>
Prolactina humana	-	<i>Sigma L-7009</i>
<i>Rio Rad Protein Assay</i>	-	<i>53277 A</i>
<i>Sepharose</i> <sup>®</sup>	-	<i>Sigma C-9192</i>
rhGH	-	<i>Genotropin</i> <sup>®</sup> Pharmacia

## RESUMO

O procedimento usual para se confirmar uma suspeita clínica de deficiência do hormônio do crescimento (GHD) é verificar se existe ausência de um pico mínimo de GH (7 ng/ml) nos testes de estímulos farmacológicos com insulina ou clonidina. Além da falta de consenso internacional sobre o valor a ser adotado para o pico mínimo de GH, atualmente variando entre 5 e 10 ng/ml, há também as diferenças existentes entre os diversos imunoenaios empregados, sobretudo em relação à especificidade do anticorpo de captura empregado em cada imunoensaio. Desta forma, foi proposto um ELISA sanduíche com o objetivo de quantificar as isoformas do hGH que possuem o sítio 1 de ligação ao receptor somatogênico. Para este fim, anticorpos policlonais de cavalo anti-hGH recombinante (rhGH) foram produzidos, purificados em coluna de afinidade com rhGH ligado covalentemente à sefarose e, em seguida, divididos em dois grupos através da utilização de uma segunda coluna de afinidade, contendo parte da hélice 4 do hGH ligada à sefarose. Os anticorpos aderidos nesta coluna foram posteriormente eluídos com solução ácida e utilizados como anticorpos de “captura”, ao passo que os anticorpos que não ficaram retidos durante a passagem pela segunda coluna foram conjugados à Horseradish Peroxidase (HP) e usados como segundo anticorpo ou de marcação. Anticorpos anti-hélice 4 foram incubados numa placa, 1 µg/poço, como antígeno, utilizou-se o rhGH em concentrações de 125 a 0,98 ng/ml e o segundo anticorpo, conjugado à HP em diluição de 1:1000. Verificou-se que a faixa de linearidade mais adequada para leitura de amostras desconhecidas esteve entre 1,95 e 31,25 ng/ml de rhGH e que a sensibilidade mínima testada foi de 0,12 ng/ml. O coeficiente de variação intra-ensaio foi de 4,53 e de 6,33 % para os respectivos valores de 8,16 e de 2,37 ng/ml, enquanto o coeficiente de variação interensaio foi de 6,00 e 8,27% para as concentrações de 8,67 e 14,87 ng/ml, respectivamente. As percentagens de recuperação variaram entre 96,02 e 103,82% enquanto a linearidade mostrou-se mais satisfatória para concentrações de hGH acima de 3,37 ng/ml. A especificidade do anticorpo foi avaliada utilizando-se concentrações de até 500 ng/ml do hormônio homólogo, prolactina humana, sem apresentar reação cruzada, afastando resultados de falsa imunorreatividade. Comparando-se o ELISA sanduíche com o IRMA, na quantificação de hGH de 436 amostras de 73 meninos e 36 meninas submetidos aos testes de estímulo com clonidina, verificou-se que as maiores discrepâncias aconteceram com valores abaixo de 2 e acima de 20 ng/ml. Vinte e quatro amostras com determinações diferentes entre estes dois ensaios foram submetidas ao ensaio quimioluminescente e, apesar dos resultados não terem sido semelhantes, houve boa correlação entre o ELISA e o IRMA, cujo coeficiente foi de 0,90 e entre o ELISA e o ICMA foi de 0,93, ao passo que entre o ICMA e o IRMA foi de 0,89. As características deste ELISA sanduíche permitem a sua utilização na determinação de hGH na rotina laboratorial de pacientes com GHD, porém, para que seja aplicado em pesquisas na quantificação de concentrações mais baixas de hGH, seriam necessários estudos adicionais.

## SUMMARY

The usual procedure to confirm a suspicious clinical case of growth hormone deficiency (GHD) is to verify whether exist or not a minimal GH peak (7 ng/ml) on pharmacological tests with insulin or clonidine. Lack of an international consensus about the minimal peak of GH, presently ranging from 5 to 10 ng/ml, and all technical differences among available immunoassays, specially related to the capture antibody specificity contribute to divergent results among these assays. Thus, the present study was designed to prepare a sandwich ELISA to quantify all hGH isoforms that present binding site 1 to its receptor. To this end, horse polyclonal, anti recombinant hGH (rhGH) were produced and purified in affinity columns prepared with rhGH covalently bound to sepharose. The obtained antibodies were further splitted into two groups through a second affinity column prepared with a synthetic peptide correspondent to a fraction of helix 4 bound to sepharose. The antibodies retained to the second column were afterwards eluted with acidic solution and used as capture antibodies, while those with free passage through the column were conjugated to Horseradish Peroxidase (HP) and used as second or marker antibodies. One microgram of anti-helix 4 antibody was incubated in each well, with rhGH concentrations ranging from 125 to 0.98 ng/ml and second antibody, conjugated to HP, applied in a 1:1000 dilution. The working range was observed between 1.95 and 31.25 ng/ml of rhGH and the minimal tested sensibility was 0.12 ng/ml. The intra-assay variation coefficient was 4.53 and 6.33 % for rhGH values of 8.16 and 2.37 ng/ml, respectively, while the inter-assay variation coefficient was 6.00 and 8.27% for rhGH concentration of 8.67 e 14.87 ng/ml, respectively. Rate of recovery ranged between 96.02 and 103.82%, however, the best linearity (closer to 100%) was noticed for hGH above 3.37 ng/ml. Antibody specificity was evaluated incubating up to 500 ng/ml of the GH homologous hormone, prolactin, without presenting any cross-reactivity, what ruled out false immunoreactivity to hGH. Comparisons between sandwich ELISA and IRMA were made during hGH quantification of 436 samples from 73 boys and 36 girls submitted to provocative tests with clonidine and some discrepancies were found for hGH below 2 and above 20 ng/ml. Twenty four divergent samples between ELISA and IRMA were further analyzed with a immunochemiluminometric assay (ICMA), which exhibited results different from those obtained with ELISA and IRMA. However, the correlation coefficients found between ELISA and IRMA was 0.90, between ELISA and ICMA was 0.93 and between ICMA and IRMA was 0.89. The observed features of the present ELISA allow its use for determination of hGH required by routine analyses of patients with GHD, however for research purposes requiring measurements of low concentrations of hGH further optimization of this assay is necessary.

## 1 INTRODUÇÃO

A confirmação da deficiência do hormônio do crescimento (GHD) é obtida através de uma abordagem clínica sobre as variáveis antropométricas da criança como peso, altura, gordura abdominal, velocidade de crescimento, além da determinação da concentração sérica de fatores de crescimento como IGF-I e IGFBP-3 e do hormônio do crescimento (GH) após estímulo. Entretanto há grandes diferenças entre os resultados dos ensaios convencionais mais frequentemente empregados. Esta variação é atribuída à escolha do calibrador ou do padrão, ao tipo do ensaio, aos valores mínimos dos picos pós-estímulo com insulina ou clonidina e, principalmente, à heterogeneidade das formas moleculares do GH humano (hGH) circulante e à especificidade dos anticorpos a diferentes epítomos.

Ao se quantificar o hGH em amostras de pacientes em investigação de GHD, a questão clínico-laboratorial a ser respondida é se a concentração sérica de moléculas bioativas do hGH é proporcional à imunorreatividade detectada pelo imunoensaio. O método ideal para a determinação de hGH deveria apresentar a praticidade de um imunoensaio, quanto à utilização de pequenos volumes de soro e de grande número de amostras, e a capacidade de um bioensaio em caracterizar a atividade biológica de uma molécula.

Para propósitos de imunodiagnóstico, a utilização de peptídeos sintéticos ligados à *Sepharose*<sup>®</sup> em colunas de afinidade para a purificação de anticorpos policlonais é uma tentativa de se aumentar a sua especificidade e de direcioná-los a um único ou a vários epítomos.

Dessa forma os imunoensaios para hGH seriam otimizados, caso os anticorpos empregados reconhecessem epítomos de seqüências específicas deste hormônio responsáveis pela sua ação biológica junto a seus receptores, tais como o sítio 1 do hGH de ligação ao receptor somatogênico.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS IMUNOENSAIOS

Métodos imunológicos para a determinação quantitativa e qualitativa de vários tipos de moléculas têm sido utilizados como importantes ferramentas para a confirmação de diagnósticos clínicos. No processo de seleção de um imunoensaio, os principais parâmetros considerados são a sensibilidade, a especificidade, os limites de detecção e a praticidade técnica. A relação custo/benefício de reagentes e equipamentos também exerce importante influência no processo de escolha, considerando-se que o custo do resultado ideal não deve ser desnecessariamente oneroso ao usuário.

YALOW e BERSON (1959), ao desenvolverem um radioimunoensaio (RIA) para insulina, disponibilizaram um sistema capaz de ser ampliado para a determinação de outros compostos, além de servir de modelo para outras metodologias como, por exemplo, o ensaio imunorradiométrico (IRMA). Em 1968, MILES e HALES descreveram o primeiro IRMA para a quantificação de hGH sérico.

Desde então, os métodos radioimunológicos têm sido utilizados na rotina laboratorial, muito embora apresentem alguns inconvenientes tais como lixo radioativo, curta meia-vida dos radioisótopos, exigência de laboratório adequado à manipulação dos marcadores radioativos, além da periculosidade técnica. Por estas razões, técnicas mais seguras foram incorporadas, substituindo-se radioisótopos por enzimas, moléculas fluorescentes ou quimioluminescentes. Com esta nova geração de marcadores, surgiram imunoensaios para melhorar a quantificação ou a simples detecção de moléculas em pequenas concentrações, como anticorpos, enzimas, hormônios, drogas, componentes bacterianos e virais.

Durante anos, as determinações do hormônio do crescimento humano (hGH) foram realizadas através do RIA, cujo limite de detecção encontra-se próximo de 1 ng/ml. Empregando-se, porém, radioisótopos como marcadores com o método IRMA,

este valor atingiu 0,1 ng/ml. A utilização de uma fase sólida, ausente no RIA, simplificou e diminuiu o tempo de incubação (BUTLER, 2000).

A otimização dos ensaios fez com que surgissem novas metodologias, particularmente relacionadas à sequência de incubações, iniciando-se, preferencialmente, com a fixação do anticorpo de “captura” à fase sólida, seguida da incubação do antígeno e, posteriormente, adição do segundo anticorpo conjugado ao marcador (método sanduíche).

Os ensaios imunoenzimáticos foram desenvolvidos em meados dos anos 70 (ENGVALL; PERLMAN, 1971) e rapidamente ganharam popularidade devido, principalmente, à segurança quanto à utilização de materiais não radioativos mais baratos e estáveis, devido à disponibilidade de equipamentos capazes de fornecer resultados em poucos segundos e devido à possibilidade de automação com baixo custo. A baixa sensibilidade, desvantagem da utilização de ensaios imunoenzimáticos, foi contornada com a amplificação do sinal e com a produção de anticorpos com maior afinidade.

Marcadores fluorométricos, normalmente, apresentam uma vida útil maior e não oferecem maiores riscos como os radioisótopos. Sua desvantagem está no custo do equipamento e dos diversos agentes fluorescentes e na possibilidade de interferência de compostos fluorescentes presentes em amostras biológicas (SOINI; HEMMILÄ, 1979), que podem afetar a sensibilidade do ensaio. A utilização de novos agentes fluorescentes resultou em ensaios imunofluorométricos sanduíches para hGH com limites de detecção menores que o IRMA (ALBERTSSON-WIKLAND *et al.*, 1993; ANDERSEN *et al.*, 1998).

Ensaio imunofluorométrico (IFMA) e imunoquimioluminométrico (ICMA) ultra-sensíveis para hGH foram desenvolvidos apresentando limites de detecção de 0,02 ng/ml (L'HERMITE-BALÉRIAUX *et al.*, 1996), embora existam relatos de ICMA com sensibilidade de 0,005 ng/ml (IRANMANESH *et al.*, 1994) sem, necessariamente, representarem um dado adicional para o clínico, além dos obtidos com os ensaios convencionais.

A maior especificidade e afinidade do anticorpo de “captura” pelo antígeno deve ser uma preocupação inicial na preparação de qualquer tipo de ensaio. Soluções para se conseguir anticorpos mais específicos surgiram com o advento da técnica de produção de anticorpos monoclonais e com a purificação de anticorpos policlonais em colunas de afinidade (YOUNG *et al.*, 1975; TAN-WILSON *et al.*, 1976; KENT, 1994). Um anticorpo, entretanto, pode ser previamente planejado para ser específico, ainda que sua afinidade seja imprevisível, sendo freqüentemente necessário testar vários anticorpos para se encontrar aquele com as características desejadas.

O emprego de anticorpos com alta especificidade, conjugados à *Horseradish Peroxidase*, possibilitou o desenvolvimento de ensaios sanduíche com bons resultados. A sensibilidade de um enzimaímunoensaio, empregando-se biotina-estreptavidina e peroxidase, foi de 0,08 ng/ml para o hGH total e de 0,2 ng/ml para a isoforma 22 kDa (VIEIRA *et al.*, 1992).

YUKI e KATO (1994) padronizaram um ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) para os aminoácidos 32-46 da isoforma hGH 22 kDa, cuja sensibilidade alcançou o valor de 1 ng/ml. Um terceiro sanduíche para a determinação das isoformas hGH 20 e 22 kDa apresentou limites de detecção de 5 pg/ml e 50 pg/ml, respectivamente (TSUSHIMA *et al.*, 1999).

Atualmente, existem ELISAs comerciais para hGH que utilizam anticorpos conjugados à *Horseradish Peroxidase*, cuja sensibilidade atinge valores entre 1 pg/ml (REUTENS *et al.*, 1995, 1996) e 0,5 ng/ml, limites mínimos de detecção da ordem de 0,2 ng/ml (UNITED BIOTECH, 1999), embora já esteja disponível para pesquisa um ensaio ultra-sensível que emprega o sistema biotina-estreptavidina e peroxidase, cuja sensibilidade é de 0,06 pg/ml (DIAGNOSTIC SYSTEMS LABORATORIES, 2001).

As quantificações obtidas com o ELISA apresentaram boa correlação com resultados de RIAs (GRANADA *et al.*, 1990), e de IRMAs para hGH (PRINGLE *et al.*, 1992). Entretanto antes de se optar por uma metodologia, é preciso conhecer as características dos ensaios disponíveis, assim como suas vantagens e desvantagens (quadros 1 e 2), as quais devem ser consideradas na escolha do método.



QUADRO 1 – CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS IMUNOENSAIOS <sup>(1)</sup>

Técnica	Sinal	Sensibilidade	Execução	Detecta-se	Comentários
ELISA Sanduíche	Reação de cor entre Enzima e substrato	<1 ng/ml	1-24 h <sup>(2)</sup>	Proteínas séricas, anticorpos anti-agentes infecciosos, antígenos bacterianos, virais e fúngicos	Sinal 6 vezes maior que o <sup>125</sup> I, devido à capacidade de amplificação catalítica das enzimas.
RIA	Radioatividade	<1 ng/ml	2-24 h	Pequenas e grandes moléculas	Isótopos <sup>125</sup> I requerem aproximadamente 7 milhões de moléculas para gerar 1 fóton/segundo
IRMA	Radioatividade	<1 ng/ml	1-24 h	Idem ELISA	Lixo radioativo
IFMA	Fluorescência	<1 ng/ml	1-24 h	Idem ELISA e RIA	Presença de <i>background</i> ; alto custo (equipamento e marcador)
ICMA	Quimioluminescência	<1 ng/ml	15-60 min	Idem ELISA e RIA	Alto custo (equipamento e marcador). Não há amplificação do sinal, marcadores geram somente um fóton através da decomposição molecular

NOTA: <sup>1)</sup> Características gerais dos imunoenaios para diferentes tipos de substâncias.

<sup>2)</sup> A possibilidade das placas poderem ser congeladas após a primeira incubação reduz o tempo de execução do ensaio para menos de 3 horas.

FONTE: Adaptado de FELDKAMP (1996); KASAHARA e NAKAMURA (1996)

QUADRO 2 – VANTAGENS E DESVANTAGENS DOS IMUNOENSAIOS ENZIMÁTICOS

Vantagens	Desvantagens
1. Aumento da sensibilidade devido à amplificação do sinal	1. Quantificação da atividade enzimática mais imprecisa que o decaimento de alguns radioisótopos
2. Reagentes relativamente baratos, estáveis e não radioativos	2. Possibilidade da atividade enzimática ser afetada por constituintes do plasma
3. Realização de múltiplos ensaios simultaneamente	3. Maior coeficiente de variação interensaio que os radioimunoensaios
4. Possibilidade de muitas configurações diferentes	4. Podem requerer reagentes complexos
5. Equipamentos não muito caros e de fácil obtenção	
6. Adaptável à automação	

FONTE: Adaptado de KASAHARA e NAKAMURA (1996).

## 2.2 HORMÔNIO DO CRESCIMENTO HUMANO

### 2.2.1 Heterogeneidade: genes e isoformas

A somatotropina ou hormônio do crescimento (GH), a prolactina (PRL) e o hormônio lactogênico placentário (PL) ou somatomamotropina coriônica (CS) são classificados como pertencentes a uma mesma família de hormônios polipeptídicos por apresentarem características imunológicas, biológicas e estruturais semelhantes (NICOLL *et al.*, 1986). Provavelmente, os genes GH/PL e PRL originaram-se da duplicação de um gene ancestral comum ocorrida há 400 milhões de anos (GOFFIN *et al.*, 1996).

O locus genômico do hormônio do crescimento humano (hGH), localizado no braço longo do cromossomo 17 na região q22-24 (GEORGE *et al.*, 1981), expandiu-se em 5 genes altamente conservados há aproximadamente 10 milhões de anos. Estes genes apresentam-se na sequência 5' - 3': hGH-N, hCS-L, hCS-A, hGH-V, hCS-B (CHEN *et al.*, 1989) e, como se expressam em diferentes tecidos, estão sujeitos a diferentes controles hormonais. A expressão dos genes hCS-A, hCS-B, hGH-V e hCS-L ocorre nos sinciciotrofoblastos da placenta (CHEN *et al.*, 1989; LIEBHABER *et al.*, 1989; FRANKENNE *et al.*, 1990), enquanto o gene hGH-N (normal) codifica o hGH

somente nas células somatotróficas da adeno-hipófise (CHEN *et al.*, 1989; PARKS, 1989) em quantidade equivalente a 10% do peso da glândula (LEWIS, 1992).

O gene hGH-V (variante) codifica um polipeptídeo que difere da sequência primária do hGH em treze aminoácidos e representa a principal forma do hGH circulante durante a gravidez, sendo responsável pela regulação do crescimento fetal por agir sobre o metabolismo materno aumentando a disponibilidade de nutrientes para o feto (HANDWERGER, FREEMARK, 2000).

O hGH-V não é detectado no soro fetal durante a gravidez, entretanto o hGH-N atinge altas concentrações com picos de  $33,6 \pm 2,1$  ng/ml na 20.<sup>a</sup> semana de gestação e até declinar a 20 ng/ml ao nascimento. Durante a infância, os valores séricos são similares aos encontrados na idade adulta. Na puberdade, as concentrações se elevam, enquanto ocorre queda progressiva na idade adulta até a velhice (HERMAN-BONERT *et al.*, 1995).

O hGH sérico consiste em um grupo heterogêneo de formas moleculares (BAUMANN *et al.*, 1985, 1994; BAUMANN, 1991) que compreendem formas monoméricas e vários oligômeros (BAUMANN, STOLAR, 1986; BAUMANN, 1991) secretados pela hipófise, formados *de novo* ou secretados pela placenta durante a gravidez (BAUMANN *et al.*, 1994). Entre as isoformas mais estudadas, codificadas pelo hGH-N, encontram-se uma cadeia polipeptídica com peso molecular de 22 kDa composta de 191 aminoácidos e duas pontes dissulfeto internas entre as cisteínas 53-165 e 182-189 (WALLIS, 1978) e outra com 20 kDa, composta de 176 aminoácidos, resultado de um *splicing* alternativo do RNA mensageiro no exon 3 com perda dos aminoácidos 32-46 (LEWIS *et al.*, 1978, 1994; MILLER, EBERHARDT, 1983).

Existe uma correlação positiva entre as concentrações séricas das isoformas 20 e 22 kDa, sugerindo que a secreção de ambas ocorre em paralelo (ISHIKAWA *et al.*, 1999) e, mesmo após estímulo farmacológico, não há alteração na proporção existente entre as isoformas em comparação ao basal (BAUMANN, STOLAR, 1986). Estudos demonstram que, em soro humano, as proporções entre as isoformas 22 kDa, 20 kDa e outras como 5 kDa, 17-kDa e 27-kDa, após estímulo com L-Dopa, são de 85%, 7% e de 5 a 10%; e, após GHRH, são de 83%, 11% e 6% (STOLAR *et al.*, 1984). Segundo

TSUSHIMA *et al.* (1999), o percentual do hGH 20 kDa é de 6,3, enquanto, para BAUMANN e STOLAR (1986), esta isoforma corresponde a aproximadamente 16% do total das isoformas. Entretanto uma proporção bem maior de hGH 17 kDa (hGH 44-191), em torno de 82-89% do hGH circulante, foi encontrada por LEWIS *et al.* (1994). Além destas, estão presentes na circulação moléculas desaminadas, aciladas e formas imunorreativas denominadas *big big* com peso molecular de 90 kDa. Parte destas moléculas corresponde ao hGH ligado a uma proteína carreadora de 61 kDa, denominada proteína ligadora de hGH (*Growth Hormone Binding Protein*) ou GHBP (BAUMANN *et al.*, 1986; BAUMANN *et al.*, 1988a), a qual deriva da clivagem proteolítica do receptor de membrana (LEUNG *et al.*, 1987).

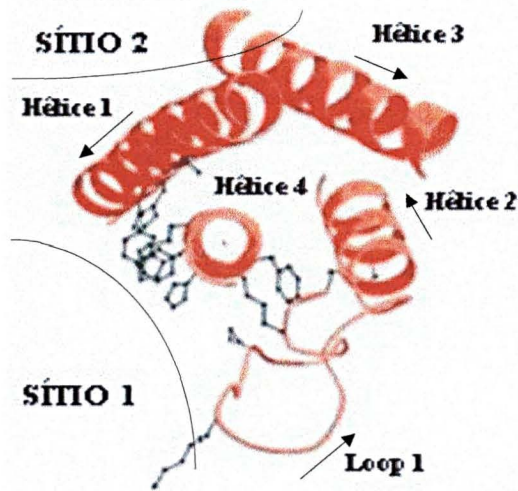
Formas com 16 kDa, 12 kDa e 30 kDa foram encontradas no plasma, porém suas origens são desconhecidas, não sendo possível afirmar se são secretadas ou se derivam do metabolismo periférico do GH (BAUMANN, 1991). Outras isoformas resultantes de proteólise também são encontradas na circulação, porém apresentam pouca (BAUMANN, 1991) ou nenhuma atividade biológica (STRASBURGER, 1994).

### 2.2.2 Interação com o receptor somatogênico

Em crianças, menos da metade das formas circulantes do hGH está ligada à GHBP, ou seja, de 28,5 a 45% das isoformas 22 kDa estão complexadas a esta proteína (BAUMANN *et al.*, 1988a, 1988b). A GHBP é idêntica ao domínio extracelular do receptor de hGH ou hGHR (LEUNG *et al.*, 1987), o qual pertence a uma grande família de receptores para citocinas, à qual se incluem os receptores para prolactina, eritropoetina, interleucinas, fatores estimulantes de colônia (granulócito e granulócito/macrófago), entre outros (MELLADO *et al.*, 1997).

A dimerização do receptor é possível pela existência de dois sítios de ligação existentes na molécula do hGH. O primeiro, denominado sítio 1, consiste em segmentos descontínuos, isto é, uma região composta pela parte central da hélice 1, parte da carboxila terminal da hélice 4 e o *loop* 1 (GOFFIN *et al.*, 1996), sendo que a

FIGURA 1 – MOLÉCULA TRIDIMENSIONAL DO hGH



O hGH liga-se ao receptor de membrana através de dois sítios, sendo que o primeiro, denominado sítio 1, consiste da parte central da hélice 1, parte da carboxila terminal da hélice 4 e parte do *loop* 1, e o segundo, sítio 2, é delimitado pelas hélices 1 e 3 (GOFFIN *et al.*, 1996).

interface entre o sítio 1 e o receptor abrange 30 resíduos do GH (CLAKSON; WELLS, 1995), enquanto o segundo epítipo, denominado sítio 2 (figura 1), é delimitado pelos resíduos pertencentes à amina terminal e às hélices 1 e 3 do hGH (GOFFIN *et al.*, 1996).

Nas células alvo, em determinadas situações fisiológicas, as moléculas de hGH 22 kDa (GOFFIN *et al.*, 1996) e de hGH 20 kDa, além de apresentarem atividades

semelhantes quanto ao estímulo da transcrição de IGF-I em células Ba/F3- hGHR (YOSHIZATO *et al.*, 2000), promovem a dimerização do receptor de maneira seqüencial. Esse processo desenvolve-se previamente em duas etapas: inicialmente uma molécula do receptor liga-se ao sítio 1 do hGH (etapa 1) formando um complexo intermediário hGH.(hGHR) 1:1 inativo; em seguida, esta mesma molécula de hGH liga-se a outra molécula do receptor através de um epítipo (CUNNINGHAM *et al.*, 1991), denominado sítio 2 (etapa 2), formando um complexo ativo hGH.(hGHR)<sub>2</sub>.

O principal alvo na estrutura do hGH é o sítio 1, região escolhida para a seleção de anticorpos devido à importância na interação entre o hGH e seu receptor e, ainda, por se tratar do único sítio da molécula que não apresenta anticorpos comerciais disponíveis ou em pesquisa. Procurou-se, assim, incluir nesta revisão todas as considerações sobre a geração e purificação de anticorpos a partir de um peptídeo sintético, bem como sobre as possibilidades de haver reação cruzada entre os anticorpos com hormônios semelhantes ao hGH como a prolactina.

Um estudo baseado em ensaios imunofuncionais (IFAs) demonstrou que a isoforma 20 kDa apresenta apenas 53,3% de potência de ligação ao receptor quando comparado ao hGH 22 kDa (STRASBURGER *et al.*, 1996). Uma possível explicação

para essa discrepância talvez seja a mudança conformacional que acontece na região do sítio 1 e que dificulta a formação do primeiro complexo hGH.(hGHBP) 1:1 (WADA *et al.*, 1997). Entretanto estudos mais recentes propuseram que o hGH 20 kDa forma um complexo com o receptor com a mesma eficiência que a isoforma 22 kDa (TSUNEKAWA, *et al.*, 2000). Este dado está de acordo com os achados de que o hGH 20 kDa apresenta, assim como a isoforma 22 kDa, atividade somatogênica em ratos com nanismo espontâneo (ISHIKAWA *et al.*, 2000).

Concentrações elevadas da isoforma 22 kDa podem saturar o receptor, resultando em antagonismo. Isto ocorre porque todos os epítomos de ligação do receptor, inclusive os de ligação ao sítio 2 do hGH, são ocupados pelos sítios 1, impedindo a formação de um complexo com dois receptores e, conseqüentemente, a transdução de sinais (CUNNINGHAM *et al.*, 1991; WELLS, 1996).

A ligação ao hGH leva à dimerização do receptor acompanhada pela fosforilação e ativação de tirosinas quinases Janus 2 - JAK2 (CARTER-SU; RUI, 2000) e de alguns fatores de transcrição citoplasmáticos como *Signal Transducence and Activation of Transcription* ou STAT (HAN *et al.*, 1996) e *Insulin Receptor Substrate* ou IRS 1 e 2 (ARGETSINGER *et al.*, 1995; 1996) culminando na ativação de genes responsáveis por respostas biológicas.

### 2.2.3 Principais atividades biológicas

Embora sua denominação não conceitue adequadamente sua multiplicidade em termos de ações biológicas, o hGH, além de estimular o crescimento longitudinal dos ossos, direta ou indiretamente por meio da atividade do IGF-I (DAUGHADAY, 2000; LE ROITH *et al.*, 2001), exerce atividade lipolítica, anabólica sobre o metabolismo de proteínas e carboidratos, estimula a lactação e a ornitina carboxilase hepática, regula o sistema imune, promove retenção de água e sódio (STRASBURGER, 1994) e também a di-hidroxilação do 25-OH-vitamina D<sub>3</sub> no fígado (BOUILLON, 1991).

A atividade do hGH em estimular a gliconeogênese, lipogênese e a síntese de proteínas foi relacionada à atividade insulina símile do fragmento 17kDa, hGH<sub>44-191</sub>, (SINHA; JACOBSEN, 1994), que é incapaz de promover o crescimento, mas apresenta atividade diabetogênica 10 vezes mais ativa que o hGH 22 kDa em modelo animal, enquanto o fragmento 5 kDa (hGH<sub>1-43</sub>), ainda em estudo (LÓPEZ-GUAJARDO *et al.*, 1998), mostrou-se ser um potencializador de insulina em camundongos (FRIGERI *et al.*, 1988). Estudos de TOWNS *et al.* (1992) sugerem que a amina terminal da molécula do GH está envolvida não só na promoção do crescimento, mas também com a atividade semelhante à da insulina, enquanto outros indicam que os treze primeiros aminoácidos desta região são necessários a sua atividade lactogênica (STRASBURGER *et al.*, 1989a).

#### 2.2.4 Analogia estrutural e funcional com a prolactina

A prolactina (PRL) é um hormônio polipeptídico com 23 kDa, cuja sequência apresenta 199 aminoácidos e três pontes dissulfeto entre as cisteínas 4 e 11, 58 e 174 e, 191 e 199, além de ser secretado principalmente pela adeno-hipófise em todos os vertebrados (MILLER; EBERHARDT, 1983). As atividades biológicas deste hormônio são mediadas pelo receptor lactogênico (PRLR) que, assim como o GHR, pertence à família dos receptores de citocinas (MOUTOUSSAMY *et al.*, 1998).

Entre as suas inúmeras atividades biológicas, a PRL está principalmente envolvida com fenômenos tais como lactação, reprodução, osmorregulação e imunomodulação (GOFFIN *et al.*, 1996).

Os receptores destes hormônios são semelhantes quanto à estrutura tridimensional e às características de transdução de sinal (KINET *et al.*, 1999), o que faz com que o hGH tenha aumento da afinidade pelo PRLR em presença de zinco, fenômeno que caracteriza seu efeito lactogênico (GOFFIN; KELLY, 1997). Porém foi demonstrado que os aminoácidos envolvidos na ligação do hGH e da hPRL ao receptor lactogênico não são idênticos e não estão localizados em posições



equivalentes nas respectivas moléculas (STRASBURGER *et al.*, 1989a; CUNNINGHAM; WELLS, 1991).

Embora a PRL humana apresente 79,6% de seus aminoácidos diferentes da sequência do hGH (MILLER; EBERHARDT, 1983), o hormônio lactogênico liga-se ao seu receptor de forma semelhante ao hGH, através dos dois sítios, 1 e 2, levando-o à dimerização (BOLE-FEYSOT *et al.*, 1998). Apesar de todas as semelhanças entre GH e PRL, acredita-se que a causa da PRL não ser reconhecida pelo receptor somatogênico reside no fato de sua cadeia polipeptídica possuir somente 6 (Leu15, Phe9, Gln73, Lys181, Cys191, Arg192) dos 25 aminoácidos responsáveis pela ligação do hGH ao seu receptor (GOFFIN *et al.*, 1996).

As sequências aa 8-28, aa 58-66, aa 81-88 e aa 164-183 do hGH apresentam uma excelente homologia com os fragmentos correspondentes na PRL (RIVERO *et al.*, 1990), e, curiosamente, as três regiões que constituem o sítio 1 do hGH de ligação ao receptor estão entre os segmentos citados (GOFFIN *et al.*, 1996). Portanto, para se produzir um anticorpo, seja ele monoclonal ou policlonal purificado anti-sítio 1, o antígeno utilizado deve apresentar o maior número de aminoácidos comprovadamente essenciais para a atividade biológica e, ainda, possuir o menor número de aminoácidos em comum com a PRL de forma a diminuir ou eliminar a reação cruzada.

Como ilustrado na figura 3, a hélice 1 possui apenas 5 aminoácidos importantes (GOFFIN *et al.*, 1996) e 8 aminoácidos em comum com a prolactina,

FIGURA 2 – LOCALIZAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS SELECIONADAS EM RELAÇÃO ÀS PONTES DISSULFETO

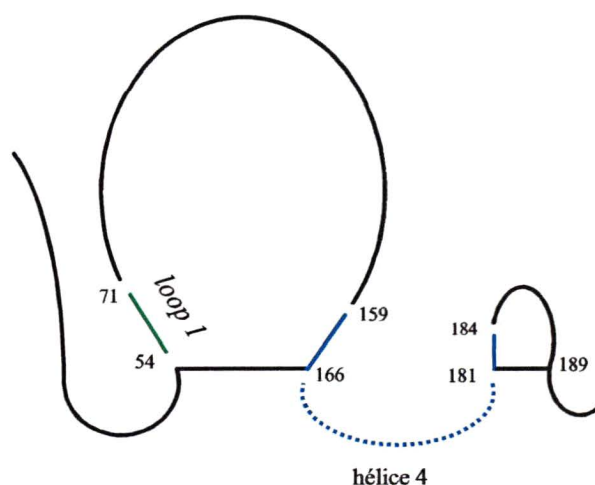


Ilustração da isoforma 22 kDa do hGH. A sequência selecionada do loop 1 (AA 53 – 71) está evidenciada em verde (AA 54 – 71) com ausência da cisteína 53 que faz ponte dissulfeto com a cisteína 165 da hélice 4 (AA 159-184), em azul, cujo segmento escolhido está pontilhado (AA 166-181) com exclusão da cisteína 182 que faz ponte dissulfeto com a cisteína 189.

FONTE: Adaptado de Lewis *et al.*, 1994.

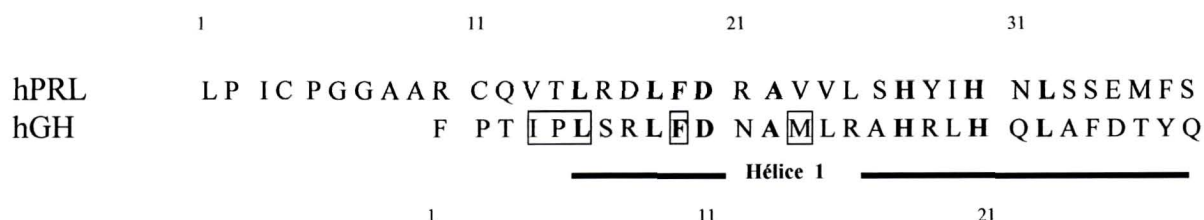


enquanto o *loop* 1 e a hélice 4 apresentam 9 e 10 aminoácidos essenciais à atividade biológica e, 7 e 10 aminoácidos em comum com a prolactina cada um, respectivamente.

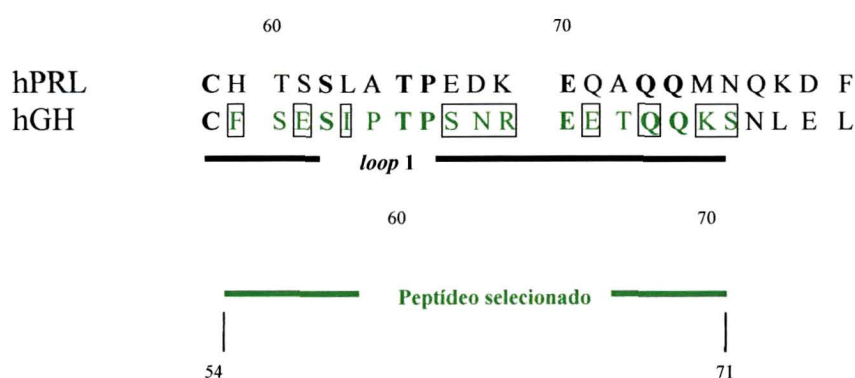
As duas melhores seqüências que se enquadram nos critérios propostos são as do *loop* 1 (aa 53-71) e da hélice 4 (aa 159-184). Ambos os segmentos, porém, possuem cisteínas que formam pontes dissulfeto. Felizmente estas cisteínas encontram-se nas extremidades das seqüências, mais precisamente no aminoácido 53 no *loop* 1 e nos aminoácidos 165 e 182 na hélice 4 (figura 2). Acredita-se que a exclusão das mesmas não prejudica a estrutura tridimensional do segmento. Portanto o peptídeo selecionado como representante do *loop* 1 consiste do fragmento entre os aminoácidos 54 e 71 e, para a hélice 4, a seqüência entre os aminoácidos 166 e 181 (figura 3). Mesmo não correspondendo à seqüência inteira, os peptídeos sintetizados, utilizados na purificação dos anticorpos, serão mencionados no texto muitas vezes como seqüências do *loop* 1 ou da hélice 4.

FIGURA 3 – COMPARAÇÃO ENTRE AS SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS QUE COMPÕEM O SÍTIO 1 DE LIGAÇÃO DO hGH AO SEU RECEPTOR COM AS SEQUÊNCIAS CORRESPONDENTES PERTENCENTES À PROLACTINA HUMANA (hPRL).

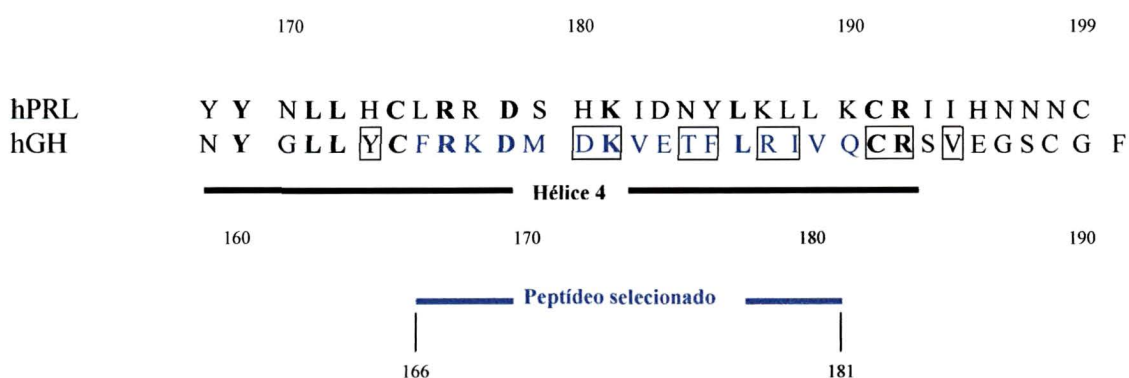
### Amina terminal



### Loop 1



### Carboxila terminal



Os resíduos numerados acima e abaixo das seqüências referem-se à hPRL (TAKAHASHI *et al.*, 1984; BLINK, PUBMED, RELATED SEQUENCES, TAXONOMY, 2001) e ao hGH (DE NOTO *et al.*, 1981), respectivamente. Os peptídeos selecionados para a síntese (54–71 e 166–181) estão evidenciados em **verde** e em **azul**, respectivamente. Os aminoácidos importantes à atividade biológica do hGH estão marcados pelo retângulo e os resíduos em comum entre as seqüências estão em **negrito**.

## 2.3 QUANTIFICAÇÃO DO HORMÔNIO DO CRESCIMENTO

### 2.3.1 Diagnóstico de deficiência de hGH

Uma vez caracterizado o diagnóstico de deficiência do hormônio do crescimento (GHD), utiliza-se, como terapia, a reposição hormonal através da aplicação de injeções subcutâneas diárias do hormônio do crescimento humano recombinante (rhGH), ocasionando desconforto ao paciente e um aumento substancial no custo do sistema público de saúde. Por isso há necessidade de que o diagnóstico seja criterioso.

Na grande maioria dos países, a confirmação da GHD é obtida através de uma avaliação clínica das variáveis antropométricas da criança, como peso, estatura, gordura abdominal, velocidade de crescimento, determinação de fatores de crescimento e concentrações do GH sérico após estímulo.

A interpretação da concentração de GH pós-estímulo como limite normal na fase puberal é baseada em valores encontrados em crianças de crescimento normal, os quais variaram entre 5 ng/ml e 10 ng/ml nos últimos 20 anos (TILLMANN *et al.*, 1997), embora existam relatos de crianças normais com concentrações de GH inferiores às citadas (MAURAS *et al.*, 2000). O uso de concentrações séricas, consideradas limítrofes (*cut off*), que separam valores abaixo e acima do normal, apresenta algumas dificuldades, como, por exemplo, a definição do que é realmente patológico (BANFI *et al.*, 1991; ANDERSSON *et al.*, 1995), sobretudo em relação às diferenças, referentes aos resultados, encontradas entre imunoensaios que utilizam uma mesma referência internacional do hormônio do crescimento como calibrador (BANGHAM, 1985; CELNIKER *et al.*, 1989; BAUMANN, 1990; CHATELAIN *et al.*, 1990; GRANADA *et al.*, 1990).

Além dos problemas citados, muitas vezes o clínico precisa ter bom senso quanto às diferenças individuais dos pacientes e analisar o conjunto de dados clínicos e laboratoriais.

Quando um paciente com clínica compatível com GHD apresenta uma concentração sérica de hGH pós-estímulo dentro da normalidade e ausência de pico de

GH em secreção espontânea de 24 horas, geralmente aplica-se o diagnóstico de nanismo neurosecretor. Porém, caso o paciente apresente secreção espontânea de 24 horas e a presença de GHR normais, é preciso investigar a presença de GH biologicamente inativo, o que pode ser uma das razões dos casos diagnosticados como nanismo hipofisário idiopático. Embora a incidência de baixa estatura causada por um GH bioinativo seja baixa, vários estudos relatam a presença da denominada Síndrome de Kowarski (HAYEK; PEAKE, 1978; KOWARSKI *et al.*, 1978; BRIGHT *et al.*, 1983).

Os dados sugestivos da presença de GH bioinativo são os altos valores séricos de GH (basal ou sob estímulo) determinados através de imunoenaios convencionais (RIA, IRMA, etc.), as baixas concentrações de IGF-I e o aumento significativo de IGF-I após administração de rhGH seguido por um aumento no crescimento linear somático (TAKAHASHI *et al.*, 1997).

### 2.3.2 Variações analíticas dos ensaios

São três as metodologias freqüentemente empregadas na quantificação do GH sérico: ensaio imunorradiométrico, quimioluminométrico e imunoenzimático, os quais empregam anticorpos policlonais ou um ou mais anticorpos monoclonais e, como padrão, GH sintético altamente purificado (rhGH), normalmente hGH 22kDa, soro padrão ou GH natural extraído de pituitária. Os dois últimos padrões contêm várias isoformas do hormônio e, por isso, são mais representativos frente ao GH circulante (BAUMANN, 1990). Os ensaios, cujos anticorpos utilizados são policlonais, apresentam, em geral, resultados similares, entretanto as maiores discrepâncias ocorrem, com freqüência, quando os anticorpos são monoclonais (LEVIN *et al.*, 1987; JANSSON *et al.*, 1997).

A grande variação analítica existente entre os resultados é atribuída, pelo menos em parte, à escolha do calibrador (STRASBURGER *et al.*, 1996) ou do padrão (CELNIKER *et al.*, 1989), ao tipo do ensaio, às diferenças entre a matriz para o padrão

e para as amostras (FELDER *et al.*, 1989) e, principalmente, à heterogeneidade das formas moleculares do GH humano (hGH) circulante e à especificidade dos anticorpos a diferentes epítomos (CELNIKER *et al.*, 1989; STRASBURGER *et al.*, 1989b, STRASBURGER, 1990; BAUMANN, 1991; STRASBURGER, 1994; MELLADO *et al.*, 1996).

Há uma grande divergência entre os autores quanto à interferência ou não da GHBP nos resultados (EBDRUP *et al.*, 1999). Dependendo do tipo de ensaio, acredita-se que haja interferência (BAUMANN, 1990). Nos ensaios realizados por JANSSON *et al.* (1997), houve diminuição do reconhecimento do hGH por parte de anticorpos monoclonais e policlonais com a adição de GHBP. Em ensaios sanduíche, anticorpos monoclonais não reconhecem o epítomo estando a molécula ligada à GHBP (GRANADA *et al.*, 1990). Entretanto o ensaio imunofuncional proposto por STRASBURGER *et al.* (1996), caracterizado pela presença de anticorpo monoclonal anti-sítio 2, mostrou-se indiferente quanto à presença ou não da proteína de ligação. Nos ensaios analisados por JAN *et al.* (1991), houve pequena interferência da GHBP devido à ligação inespecífica, porém o autor a considerou como contagem zero, eliminando seu efeito ao final dos cálculos.

Os diferentes resultados entre os ensaios podem não ter efeito prático sobre as baixas concentrações séricas de hGH que caracterizam a GHD, porém podem influenciar na decisão de tratar ou não um paciente com deficiência parcial de GH (CHATELAIN *et al.*, 1990).

### 2.3.3 Novos ensaios: uma tentativa de otimizar diagnósticos

Uma das principais limitações dos imunoensaios convencionais está relacionada à incapacidade dos mesmos em distinguir as isoformas biologicamente ativas de outras isoformas ou fragmentos que não apresentam atividade biológica (STRASBURGER *et al.*, 1996). Na maioria das vezes, há desconhecimento quanto aos

epítomos reconhecidos pelos anticorpos monoclonais ou policlonais empregados. (STRASBURGER, 1994; HASHIMOTO *et al.*, 1998).

As informações fornecidas por estes ensaios analíticos representam somente a quantificação da imunorreatividade das isoformas do hGH presentes na amostra (STRASBURGER *et al.*, 1996), dependendo ainda da especificidade dos anticorpos empregados no ensaio aos epítomos das isoformas, dos fragmentos e dos agregados do hGH.

Na tentativa de se propor outras formas de quantificação do hGH, novos ensaios foram desenvolvidos. Considerando a importância funcional de ambas as isoformas hGH 20 e 22 kDa, é importante que sejam revistos os imunoensaios capazes de evidenciar defeitos funcionais do hGH, salientando aqueles que apresentam alguma semelhança com o ensaio proposto neste estudo.

Dois ensaios, o ESTA (*eluted stain assay*) e o IFA, foram propostos para avaliar a bioatividade das moléculas do GH presentes nas amostras (STRASBURGER *et al.*, 1996; STRASBURGER; DATTANI, 1997). O ESTA foi descrito como um bioensaio para hormônios lactogênicos em que se avalia a resposta proliferativa em cultura de linhagens celulares de linfoma de rato (Nb2) quando em presença do hGH e prolactina, visto que o receptor prolactinogênico destas células apresenta uma grande afinidade pelos hormônios humanos (TANAKA *et al.*, 1980). O ESTA é baseado na redução colorimétrica de um sal amarelo, brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il) 2,5-difenil-tetrazolium ou MTT, para uma intensa coloração púrpura quando ocorre a formação de hormônio lactogênico nas células Nb2. As células são lisadas e tratadas com detergente acidificado, e o corante é eluído do meio e quantificado através de uma leitora de microplacas a um comprimento de onda 595 nm e de 655 nm. Este bioensaio possui um alto custo e tem como resultado uma maior concentração do GH bioativo do que imunorreativo em amostras de testes de estímulo, entretanto demonstrou correlação com os resultados do IRMA monoclonal (DATTANI *et al.*, 1995) e do IFA (descrito no item 2.3.3.1).

Os imunoensaios apresentam geralmente maiores vantagens sobre os bioensaios em termos de sensibilidade e praticidade, porém seus resultados são

variáveis e refletem a imunorreatividade de uma proporção indefinida de isoformas do hGH.

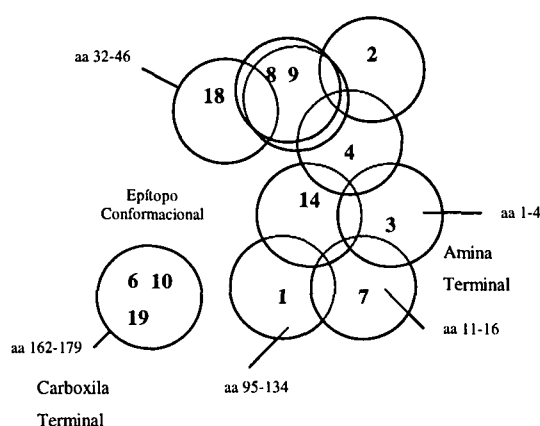
Dessa forma, a técnica ideal para a quantificação de hGH circulante deveria seguir alguns critérios como: 1) a praticidade de um imunoensaio quanto à utilização de pequenos volumes de soro e grande número de amostras e, 2) a significância da atividade biológica evidenciada em bioensaios (STRASBURGER; DATTANI, 1997; STRASBURGER, 1998).

#### 2.3.3.1 Caracterização dos epítomos do hGH em relação à bioatividade

Na tentativa de se desenvolver um imunoensaio capaz de evidenciar a bioatividade do hGH, anticorpos anti-sítios específicos do hGH foram produzidos com o objetivo de caracterizá-los e de verificar a ocorrência de reação cruzada desses anticorpos com fragmentos do hGH resultantes de clivagem enzimática endógena. Em geral, a reatividade entre anticorpos anti hGH 22 kDa e fragmentos que, inevitavelmente possuem estrutura tridimensional diferente, é baixa, mas significativa nos casos em que a seqüência de aminoácidos dos fragmentos corresponde a de um epítopo reconhecido pelos anticorpos (STRASBURGER *et al.*, 1989b).

Os anticorpos 6, 10 e 19 que reconheceram os epítomos próximos à carboxila terminal do hGH 22 kDa (figura 4), onde se localiza a hélice 4 que é correspondente à parte do sítio 1 de ligação ao receptor, mostraram maior especificidade pelo hGH do que pelo hormônio lactogênico com o qual possui 85% de homologia, enquanto o anticorpo 14 apresentou 100% de reação cruzada com o denominado

FIGURA 4 - MAPEAMENTO DOS EPÍTOPOS DO  
hGH



FONTE: STRASBURGER, 1990

epítopo conformacional do hormônio lactogênico. O efeito lactogênico do hGH parece ser mediado por epítomos localizados na sequência da amina terminal da molécula. O anticorpo 18 não apresentou reatividade em relação a isoforma hGH 20 kDa, motivo pelo qual se deduziu que este anticorpo reconhece a sequência de aminoácidos 32-46 inexistente nesta isoforma, sugerindo que este epítopo apresenta o mínimo de relevância na ligação do hGH com seu receptor. O anticorpo em questão não reconheceu GHs de outras espécies e não houve reação cruzada detectável com a prolactina humana (STRASBURGER, 1990).

A disponibilidade de vários anticorpos monoclonais anti-hGH induz o reconhecimento da importância da especificidade aos epítomos em imunoenaios para hGH (STRASBURGER, 1990).

Outra contribuição, quanto à biologia do hGH, foi dada por CUNNINGHAM *et al.* (1991), cujas técnicas de mutação pontual e expressão de mutantes, usando DNA recombinante, identificaram parte da carboxila terminal da quarta e última  $\alpha$ -hélice e partes da conexão entre a primeira e segunda  $\alpha$ -hélices como as regiões que interagem com o receptor somatotrófico.

A principal vantagem destes estudos reside no fato de que, uma vez os sítios de ligação ao receptor tenham sido reconhecidos, e os anticorpos tenham sido caracterizados, eles podem ser empregados como ferramentas em imunoenaios que detectem somente as isoformas do hormônio que são capazes de produzir um efeito biológico, interpretando, assim, a imunorreatividade positiva como indicação da existência da sequência normal do hGH. Dessa forma, alguns dos epítomos identificados podem ter um papel funcional importante, como o de ligação ao seu receptor.

Baseando-se nos estudos da relação estrutura-função do hGH e na identificação de um anticorpo monoclonal anti epítopo do sítio 2 da molécula do hGH que interage com seu receptor, STRASBURGER *et al.* (1996) desenvolveram um ensaio imunofluorescente, denominado pelo autor como ensaio imunofuncional para hGH (hGH - IFA), que utiliza o anti-sítio 2 como anticorpo de “captura” e uma GHBP recombinante, ligada ao sítio 1 do hormônio do crescimento, marcada com biotina,



representando o domínio extracelular do receptor somatogênico. Este imunoensaio foi desenvolvido com o objetivo de quantificar somente formas moleculares do hGH capazes de se ligarem ao receptor, de promoverem sua dimerização e, como consequência, iniciar a transdução de sinais às células alvo (CHEN *et al.*, 1997).

Utilizando-se um mesmo padrão de rhGH, 128 amostras de soro de diferentes pacientes foram comparadas entre si quanto aos resultados obtidos com a utilização do hGH-IFA e de um RIA que utiliza anticorpos policlonais. O autor observou que, com diferentes calibradores, 27 a 30% das formas moleculares do GH, que foram reconhecidas pelo RIA, não expressavam os sítios de ligação ao receptor reconhecidos pelo hGH-IFA, ou seja, não eram capazes de iniciar a transdução de sinais nas células-alvo. Após várias tentativas, os autores não obtiveram sucesso na produção de um anticorpo monoclonal anti-sítio 1 (STRASBURGER *et al.*, 1996).

Deve-se considerar que a concentração de GH bioativo não reflete necessariamente o grau da transdução de sinal através dos receptores (STRASBURGER, 1994). Embora estejam longe do ideal, os ensaios para GH são as ferramentas bioquímicas mais utilizadas, e a combinação destes resultados com a quantificação de IGF-I e IGFBP-3 possa ser usada mais eficientemente na confirmação de GHD (STRASBURGER, 1994; TILLMANN *et al.*, 1997; MAURAS *et al.*, 2000).

## 2.4 DESENVOLVIMENTO DO ELISA SANDUÍCHE

Com o objetivo de reduzir as dificuldades de natureza econômica, na importação de *kits* e, de natureza científica, ao possibilitar o desenvolvimento de imunoensaio com outra especificidade para auxiliar a investigação clínico-laboratorial, anticorpos policlonais específicos ao hGH foram produzidos e purificados, extraindo-se apenas os anticorpos que reconhecessem o sítio 1 de ligação ao receptor. Parte destes anticorpos foram conjugados à *Horseradish Peroxidase* com o objetivo de serem empregados em um ELISA sanduíche capaz de reconhecer somente as moléculas biologicamente ativas em relação ao sítio 1 do hGH. O protocolo do ensaio

tem como objetivo satisfazer a condição mínima aceitável para análises clínicas relacionadas à concentração de hGH em crianças e adultos, ou seja, variação de 1 a 10 ng/ml de hGH.

Para a produção de anticorpos, várias espécies de mamíferos foram avaliadas (quadro 3), sendo a eqüina e a bovina as mais adequadas devido à grande superfície corporal e devido ao GH destes animais apresentar 33,2% e 34,8% dos aminoácidos diferentes do hGH, respectivamente (ZAKIN *et al.*, 1976; WALLIS, 1978). Entretanto o eqüino é uma espécie mais conveniente devido às facilidades de acomodação durante o período de imunização e à diferença existente entre o GH animal e humano em relação às seqüências do *loop* 1 e hélice 4 do sítio 1 de ligação do hGH ao seu receptor (figura 5).

QUADRO 3 – PERCENTAGEM DE AMINOÁCIDOS DIFERENTES ENTRE OS GHs DE MAMÍFEROS

GH	bovino	ovino	murino	eqüino	suíno
bovino	0				
ovino	1,3%	0			
murino	8,4%	8,4%	0		
eqüino	10,8%	11,6%	3,8%	0	
suíno	11,3%	11,7%	4,7%	1,8%	0
humano	34,8%	35,6%	33,0%	33,2%	26,5%

Diferença em percentagem entre as seqüências de aminoácidos que constituem os hormônios do crescimento de várias espécies de mamíferos. FONTE: Adaptado de WALLIS, 1978

FIGURA 5 – COMPARAÇÃO ENTRE AS SEQÜÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS CONSTITUINTES DO SÍTIO 1 DO hGH E AS SEQÜÊNCIAS CORRESPONDENTES AO GH EQUINO.

	1	11	21	31
eGH	FPAMPLSSLF	ANAVLRA <b>QHL</b>	HQLAADTYKE	FERAYIPEGQ
hGH	FPT I PLSR <b>LF</b>	DNAMLRAHRL	HQLAFDTYQE	FEEAYIPKEQ
	1	11	21	31
	<hr style="width: 100%; border: 1px solid black;"/> Hélice 1 <hr style="width: 100%; border: 1px solid black;"/>			
	41	51	61	71
eGH	RYS*IQNAQA	AFCFSETIPA	PTG <b>KDE</b> AQQR	SDMELLRFSL
hGH	KYSFLQNPQT	SLCFSES <b>IPT</b>	PSNRE ET <b>QQK</b>	SNLELLRISL
	41	51	61	71
		<hr style="width: 100%; border: 1px solid black;"/> Loop 1 <hr style="width: 100%; border: 1px solid black;"/>		
	81	91	101	111
eGH	LLIQSWLGPV	QLLSRVFTNS	LVF GTSD*RV	YEKLRDLEEG
hGH	LLIQSWLEPV	QFLRSVFANS	LVYGASDSNV	YDLLKDLEEG
	81	91	101	111
	121	131	141	151
eGH	IQALMRELED	GSPRAGQILK	QTYDKFDTNL	RSDDALLKNY
hGH	IQTLMGRL <b>ED</b>	GSPRTGQIFK	QTYSKFDTNS	HNDDALLKNY
	121	131	141	151
	161	171	181	190
eGH	GLLSCF <b>KKDL</b>	HKAETYLRVM	KCR R FVESSC	AF
hGH	GLLYCFR <b>KDM</b>	DKVETFLR I V	QCR * SVEGSC	GF
	161	171	181	191
	<hr style="width: 100%; border: 1px solid black;"/> Hélice 4 <hr style="width: 100%; border: 1px solid black;"/>			

Comparação entre as seqüências de aminoácidos correspondentes ao sítio 1 do hormônio do crescimento humano – hGH (DE NOTO *et al.*, 1981; BLINK, PUBMED, RELATED SEQUENCES, TAXONOMY, 1999b) e as seqüências correspondentes ao GH eqüino – eGH (BLINK, PUBMED, RELATED SEQUENCES, TAXONOMY, 1999a). Para facilitar a correspondência entre os peptídeos foi necessária a utilização de asteriscos (\*) no lugar de aminoácidos inexistentes. Os aminoácidos diferentes estão evidenciados em vermelho.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Produzir um ensaio imunoenzimático (ELISA sanduíche) para determinação do hormônio do crescimento humano.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Produzir, conjugar com *Horseradish Peroxidase* e purificar anticorpos policlonais anti-rhGH através de colunas de afinidade, utilizando *Sepharose*<sup>®</sup> ligada a peptídeos correspondentes a sítios específicos do hGH;
2. Padronizar o imunoensaio utilizando-se como padrão o rhGH;
3. Verificar o possível reconhecimento da prolactina humana pelos anticorpos produzidos (reação cruzada);
4. Validar o ensaio imunoenzimático através da determinação de hGH em amostras de soro de crianças submetidas ao teste de estímulo da clonidina e compará-lo ao IRMA.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 OBTENÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS ANTI-rhGH

#### 4.1.1 Seleção do animal a ser imunizado

Os critérios para a seleção do equino para a imunização com hormônio do crescimento recombinante (rhGH) foram baseados na necessidade de obtenção de grande quantidade de soro e na maior diferença possível existente entre o GH animal e o humano em relação às seqüências selecionadas: aa 54-71 (*loop* 1) e aa 166-181 (hélice 4) do sítio 1 de ligação do hGH ao seu receptor.

#### 4.1.2 Imunização do animal

Uma égua de 9 anos nunca antes utilizada para imunizações, que pesava entre 400 - 450 kg, foi mantida sob os cuidados de veterinários do Centro de Pesquisa e Produção de Imunobiológicos (CPPI), os quais, além de dispensarem a atenção ao animal quanto à sua alimentação, foram os responsáveis por todas as imunizações e pelas coletas de sangue.

Antes da aplicação da primeira dose do antígeno, 35 ml de sangue da égua foram coletados e adotados como soro pré-imunização.

#### 4.1.3 Antígeno

O objetivo das imunizações foi o produzir anticorpos que reconhecessem as seqüências de aminoácidos 54-71 (situada no *loop* 1) e 166-181 (situada na hélice 4, mais próxima à carboxila terminal), partes importantes do sítio 1 do hGH de ligação ao

receptor de membrana. Entretanto em vez de empregar estas duas pequenas seqüências conjugadas a um hapteno para a imunização, utilizou-se a molécula inteira do hGH.

Para a imunização do animal, utilizou-se rhGH, originado do mesmo estoque que, de acordo com os endocrinopediatras da Unidade de Endocrinologia Pediátrica do Hospital de Clínicas da UFPR, apresentou bons resultados no tratamento de um grupo de crianças com deficiência de GH, indicando, portanto, a boa atividade biológica do medicamento.

A primeira dose do antígeno foi preparada dissolvendo-se 750 µg de rhGH em 2,5 ml de tampão fosfato (PBS) 0,05 M, pH 7,4. Uma emulsão foi, então, preparada ao se adicionar adjuvante *completo* de Freund em igual volume, resultando em uma concentração final de 150 µg/ml de rhGH. A segunda dose e as outras seis subseqüentes foram realizadas da mesma forma, sendo utilizado, nessas imunizações, o adjuvante *incompleto* de Freund. As injeções foram aplicadas, de 15 em 15 dias, via subcutânea e em três pontos diferentes do dorso do animal.

#### 4.1.4 Confirmação da imunização

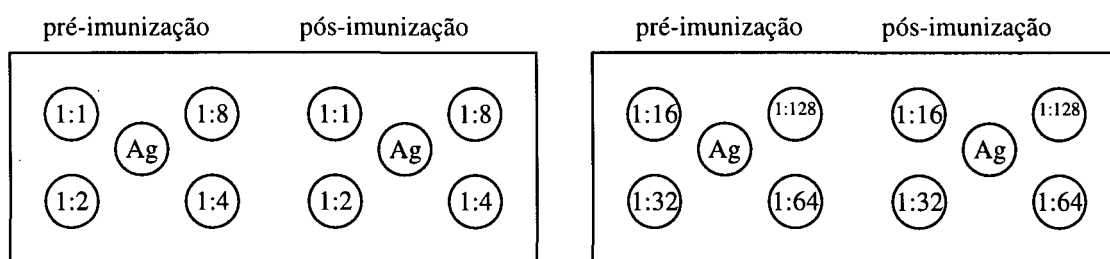
##### 4.1.4.1 Imunodifusão

Uma semana após a quinta dose, 10 ml de sangue do animal foram coletados para se avaliar a imunização através do ensaio de imunodifusão. Utilizaram-se para o teste o soro pré e pós-imunização e duas lâminas preparadas com ágar a 1% segundo o protocolo do laboratório do Dr. Carlos Olòrtegui, como explicado a seguir:

1. Duas lâminas planas e sem riscos foram limpas com álcool absoluto e secas com papel absorvente;

2. As lâminas foram colocadas sobre superfície plana, enquanto dissolvia-se 1g de ágar em 50 ml de água destilada e 50 ml de solução salina ferventes até que a solução adquirisse transparência;
3. Aproximadamente 10 ml da solução do ágar foram imediatamente adicionados a cada lâmina com o auxílio de uma pipeta de vidro até que toda a superfície fosse preenchida;
4. Após a solidificação do gel (aproximadamente 30 minutos), 5 poços foram feitos em cada lado das lâminas com o auxílio de uma ponteira de ponta larga;
5. Os soros pré e pós-imunização foram diluídos em salina nas proporções de 1:1 a 1:128 (figura 6) e adicionados aos poços em volume suficiente para o seu preenchimento. No quinto poço, localizado no centro, entre os quatro poços, foi adicionado o antígeno (Ag) rhGH dissolvido em salina em concentração de 1 mg/ml.

FIGURA 6 – DILUIÇÃO DO SORO EQUINO PRÉ E PÓS-IMUNIZAÇÃO



Esquema ilustrativo das diluições realizadas para ambos os soros da égua, pré-imunização e pós-imunização, para confirmação da imunização do animal através da formação de halos de precipitação na imunodifusão.

#### 4.1.4.2 ELISA indireto

Constatada a imunização através da imunodifusão, o animal foi submetido à nova sangria uma semana após a 7.<sup>a</sup> injeção para se determinar os títulos de seus anticorpos através do ELISA indireto, cujo procedimento foi adaptado de ENGVALL e PERLMAN (1971), como descrito a seguir:

1. Dezesseis poços de uma placa de poliestireno foram sensibilizados durante um período que variou entre 12 e 16 horas, a 4° C, com 100 µl (volume padrão) de solução por poço, contendo o antígeno rhGH dissolvido em tampão carbonato pH 9,6 (*Coating Buffer*) na concentração de 10 µg/ml;
2. Após a incubação à temperatura de 4° C, a placa foi lavada duas vezes com solução de lavagem (salina com Tween a 0,05%) para a retirada do antígeno (rhGH) que não aderiu à fase sólida;
3. Foram adicionados, à placa, 100 µl de uma solução de caseína 2% em PBS 0,05 M, pH 7,4, denominada de solução de bloqueio, com o objetivo de preencher os sítios dos poços onde não houve aderência do antígeno. A placa foi levada à estufa, por 1 hora, em temperatura de 37°C;
4. Após a incubação, lavou-se a placa por duas vezes com solução de lavagem, retirando, por inversão, todo e qualquer volume que tenha permanecido nos poços;
5. Na primeira metade da placa, com exceção da primeira coluna (branco), adicionou-se o soro do animal pós-imunização diluído de 1:2.000 a 1:256.000 em tampão de incubação (TI) constituído por PBS, 0,25% de



caseína e 0,05% Tween 20. Nos poços da outra metade, foi pipetado, em igual condição, o soro pré-imunização. A placa foi levada novamente para a incubação, durante 1 h, a 37° C;

6. Por inversão, retirou-se todo o soro dos poços que foram lavados por duas vezes com solução de lavagem. Adicionaram-se então, 100 µl de TI, que continham anticorpo de carneiro anti-imunoglobulina G (IgG) de cavalo conjugado à *Horseradish Peroxidase*, gentilmente cedido pelo Dr. Carlos Olòrtegui, em diluição 1:2.000. A placa foi incubada mais uma vez, a 37° C, por 1 hora;
7. Após esta última incubação, lavou-se a placa por, pelo menos, 6 vezes para total retirada do conjugado. A seguir, a atividade enzimática foi revelada através da adição de 100 µl de uma solução contendo, como substrato, orto-fenilenodiamina (OPD) em concentração de 0,33 mg/ml dissolvida em tampão citrato pH 5,2 e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 0,04%. A placa foi deixada em local sem incidência de luz, por 15 minutos, e à temperatura ambiente.
8. Passados os 15 minutos, a reação foi interrompida pela adição de 20 µl de ácido sulfúrico concentrado em diluição 1:20.

Os títulos dos anticorpos foram determinados em função da intensidade da coloração na primeira metade da placa, cuja absorbância foi obtida em comprimento de onda de 490 nm.

Duas semanas após a oitava e última imunização, foram coletados 3 litros de sangue do animal. Parte do soro foi submetida à extração de imunoglobulinas G (IgG) enquanto o restante foi armazenado em alíquotas, a -80° C.

#### 4.1.5 Extração das imunoglobulinas

O soro do animal foi inicialmente submetido a um tratamento com uma solução saturada de sulfato de amônio para precipitar as moléculas de IgGs. Este procedimento apresenta a vantagem de não desnaturar as proteínas e de dar estabilidade à solução.

A extração das imunoglobulinas foi feita utilizando-se um protocolo modificado da AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH (1998), como descrito:

1. Uma parte do soro do animal, aproximadamente 500 ml, foi centrifugada à 10.000 rpm em centrífuga a 4° C;
2. Adicionou-se Tris-HCl 1 M, pH 8,0, à amostra do soro em proporção 1:10 com o objetivo de se alcalinizar a solução;
3. Sob leve agitação, adicionou-se, aos poucos, a solução de sulfato de amônio (a solução tornou-se esbranquiçada com aproximadamente 20% de saturação). Esta mistura foi mantida sob agitação leve por aproximadamente 1 hora em *shaker* a 4° C;
4. Novamente a solução foi centrifugada por aproximadamente 20 minutos, 10.000 rpm e a 4° C;
5. O sobrenadante foi descartado, e o precipitado, lavado por duas vezes com 40 ml de PBS 0,05 M, pH 7,4, utilizando-se uma centrífuga a 4° C;
6. Após a última lavagem, o precipitado foi dissolvido em aproximadamente 40 ml de PBS 0,05 M, pH 7,4, e dialisado em membrana de celulose previamente fervida. Esta membrana retém mais de 90% das moléculas com peso molecular acima de 12400; A solução contendo as IgGs foi dialisada em 5 litros de PBS 0,05 M, pH 7,4, a 4° C, durante 12 horas, para completa retirada do sulfato de amônio.

Após a diálise, 2/3 da solução foram congelados em freezer, a  $-80^{\circ}\text{C}$ , enquanto o restante foi armazenado a  $8^{\circ}\text{C}$  para posterior purificação.

## 4.2 PURIFICAÇÃO DAS IMUNOGLOBULINAS

Com o propósito de separar os anticorpos específicos e eliminar os demais, três colunas de afinidade (YOUNG *et al.*, 1975; TAN-WILSON *et al.*, 1976; KENT, 1994) foram preparadas de acordo com protocolos da AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH (1993), contendo, cada uma delas, *Sepharose*<sup>®</sup> conjugada a um dos três antígenos (rhGH, sequência de aminoácidos do *loop* 1 ou da hélice 4). A solução que continha as imunoglobulinas foi eluída através das colunas (EY *et al.*, 1978) com o objetivo de se obter apenas os anticorpos que reconhecessem a molécula do rhGH (coluna *Sepharose*<sup>®</sup>-rhGH). Uma vez separados estes anticorpos anti-rhGH, estes foram eluídos por duas outras colunas para se obter as imunoglobulinas que reconhecessem apenas o segmento do *loop* 1 (coluna *Sepharose*<sup>®</sup>-sequência aa 54–71) ou o segmento da hélice 4 (coluna *Sepharose*<sup>®</sup>-sequência aa 166–181).

### 4.2.1 Colunas de afinidade

As sequências de aminoácidos do *loop* 1 e hélice 4 utilizadas na montagem das colunas de afinidade foram sintetizadas e generosamente doadas pelo Prof. Dr. Luiz Juliano Neto no Departamento de Biofísica da Universidade Federal de São Paulo.

A montagem das três colunas, *Sepharose*<sup>®</sup>-rhGH, *Sepharose*<sup>®</sup>-*loop* 1 e *Sepharose*<sup>®</sup>-hélice 4, foi realizada conforme protocolo a seguir:

1. Três gramas de *Sepharose*<sup>®</sup> ativada com brometo de cianogênio foram expandidas ao serem adicionados 15 ml de HCl 1 mM, por 15 minutos (cada grama de *Sepharose*<sup>®</sup> equivale a 3,5 ml de gel);
2. Após 15 minutos, o gel foi lavado por 5 ou 6 vezes com HCl 1 mM, utilizando-se uma centrífuga a 5.000 rpm, a 4° C, por dez minutos;
3. Em seguida, lavou-se o gel com tampão de ligação (NaHCO<sub>3</sub> 0,1 M, pH 8,3, em solução de NaCl 0,5 M). Nesta etapa, o bromo do brometo de cianogênio é retirado, e o cianogênio (-CN) ligado à *Sepharose*<sup>®</sup> está pronto para reagir com a carboxila da proteína adicionada, formando uma ligação covalente (AXEN *et al.*, 1967; CUATRECASAS, 1970; KOHN; WILCHEK, 1982)
4. Pequeno volume de tampão de ligação foi deixado no tubo para que o peptídeo adicionado (21,8 mg de rhGH, 20 mg da sequência do *loop* 1 ou 15 mg da hélice 4) se dissolvesse no gel;
5. O gel foi colocado sob agitação leve em *shaker*, por 2 horas, à temperatura ambiente;
6. Centrifugou-se o gel a 3.000 rpm, sendo parte do sobrenadante separado para doseamento dos peptídeos com a finalidade de verificar qual seria o percentual de ligação ao gel;
7. Os grupos que permaneceram ativos foram bloqueados com a adição de glicina 0,2 M, pH 8,0, em solução de NaCl 0,5 M agitando-se a solução por 2 horas em *shaker*, à temperatura ambiente;

8. O gel foi submetido a lavagens alternadas com aumento e redução de pH em cinco ciclos, descritos abaixo:

Redução de pH: 40 ml de tampão acetato 0,1 M em 0,5 M de NaCl, pH 4,0;

Aumento de pH: 40 ml de tampão bicarbonato 0,1 M em 0,5 M de NaCl, pH 8,3;

9. Após os ciclo de redução e aumento de pH, o gel foi lavado por duas vezes em PBS 0,5 M, pH 7,4, utilizando-se uma centrífuga a 3.000 rpm, por 5 minutos, a 4° C;
10. Finalmente, o gel foi colocado em um tubo próprio com sistema de ultra filtração que impede a saída do gel. Após a adição de azida sódica 0,05% (em PBS 0,5 M, pH 7,4), utilizada para conservação, a coluna de afinidade foi mantida a 4° C.

#### 4.2.2 Percentual de ligação

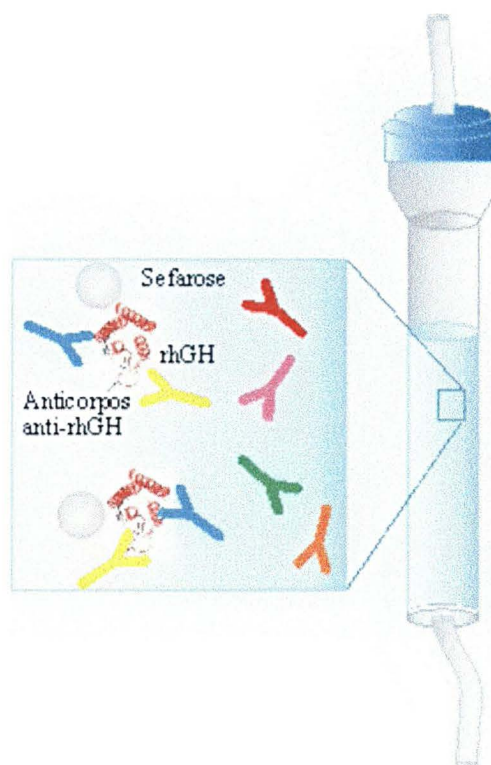
Para os cálculos da percentagem de ligação dos peptídeos à *Sepharose*<sup>®</sup>, comparou-se a absorbância da solução inicial (de adição à *Sepharose*<sup>®</sup>) com a do sobrenadante, obtidas com a leitura em comprimento de onda de 280 nm.

Para cada um dos três peptídeos adicionados às colunas, diluiu-se 0,15 ml da solução inicial em 0,95 ml de tampão fosfato 0,2 M, pH 7,4. O volume utilizado para a leitura de cada um dos sobrenadantes foi de 1,1 ml.

### 4.2.3 Purificação de anticorpos anti-rhGH

Após a extração com sulfato de amônio e diálise, as soluções com as imunoglobulinas foram eluídas, a um fluxo de 20 ml/h, através da coluna de afinidade (figura 7) constituída por *Sepharose*<sup>®</sup> ativada com brometo de cianogênio (AXEN *et al.*, 1967; CUATRECASAS, 1970; KOHN; WILCHEK, 1982) e ligada covalentemente ao rhGH (EY *et al.*, 1978). As imunoglobulinas que não apresentaram afinidade pelo ligante não ficaram retidas, enquanto os anticorpos que reconheceram o antígeno ficaram ligados ao complexo *Sepharose*<sup>®</sup>-rhGH

FIGURA 7 – COLUNA DE AFINIDADE PARA PURIFICAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-rhGH



Para eliminar as substâncias inespecíficas, cada coluna foi lavada com PBS 0,05 M, pH 7,4. Em seguida, após a solução recolhida ser eluída novamente, e a coluna ser lavada com PBS, a ligação entre o antígeno (rhGH) e os anticorpos foi desfeita com a eluição de glicina-HCl 0,1 M, pH 5,0 (TSANG; WILKINS, 1991).

Após a mudança de pH com glicina-HCl, as imunoglobulinas foram recolhidas em alíquotas de 10 ml para posterior quantificação. Cada alíquota foi examinada em espectrofotômetro a 280 nm para escolha das melhores concentrações de anticorpos. Uma vez selecionadas, as alíquotas (volumes entre 20 e 40 ml) foram colocadas em membranas de celulose para diálise, previamente fervidas. O conteúdo destas membranas foi dialisado em PBS 0,05 M, pH 7,4, durante um período de 12 a 16 h, sob agitação, a 4 °C, para a completa retirada da glicina e reversão do pH.

Após o término da diálise, as soluções contendo os anticorpos foram alíquotadas e armazenadas em freezer, a -80 °C.

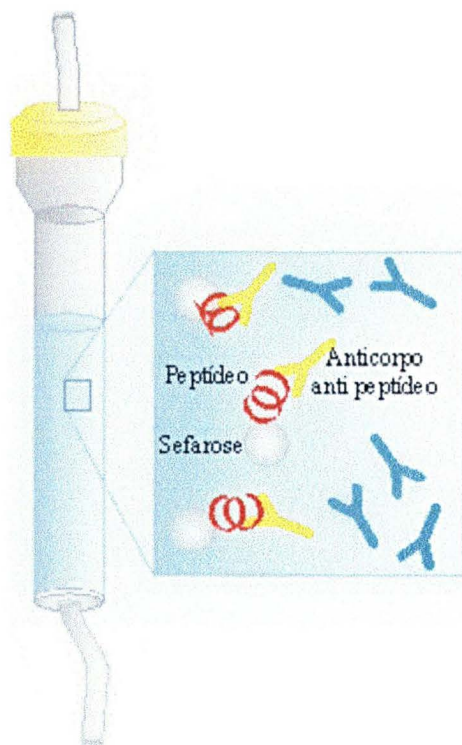
#### 4.2.4 Purificação de anticorpos anti-sítio 1

Os anticorpos policlonais anti-rhGH obtidos na primeira coluna incluem aqueles que reconhecem todos os possíveis epítomos deste hormônio. Para isolar apenas a fração daqueles que reconhecem uma das duas seqüências desejadas (*loop* 1 e hélice 4), a solução contendo os anticorpos anti-rhGH foi eluída pelas duas outras colunas: *Sepharose*<sup>®</sup>-seqüência aa 54–71 e *Sepharose*<sup>®</sup>-seqüência aa 166–181.

As colunas foram produzidas conforme protocolo acima descrito (4.2.1), porém cada uma delas tendo a *Sepharose*<sup>®</sup> ligada ao peptídeo correspondente, ou seja, a segunda ligada ao peptídeo sintético da seqüência do *loop* 1 e a terceira ligada à seqüência da hélice 4. A solução de anticorpos policlonais anti-rhGH foi eluída através dessas duas colunas ligadas em série.

Os anticorpos que reconheceram os epítomos correspondentes aos peptídeos sintéticos ficaram ligados à coluna (figura 8), enquanto os anticorpos restantes, ou

FIGURA 8 – COLUNA DE AFINIDADE PARA PURIFICAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-SÍTIO 1



seja, todos os outros anticorpos anti-rhGH (menos aqueles anti *loop* 1 e anti-hélice 4) foram recolhidos durante a lavagem com PBS 0,05 M, pH 7,4, para posterior conjugação à *Horseradish Peroxidase*.

A eluição da glicina-HCl 0,1 M, pH 5,0 fez com que a ligação existente entre os peptídeos e os anticorpos que o reconheceram fosse desfeita; os anticorpos anti-sítio 1 puderam, então, ser aliqüotados para posterior diálise.

Cada aliqüota foi lida em espectrofotômetro a 280 nm para escolha das melhores concentrações de imunoglobulinas. Uma vez escolhidas as aliqüotas, volumes entre 20 e 40 ml foram colocados em

membranas de diálise previamente fervidas. Estas membranas foram colocadas em diálise em PBS 0,05 M, pH 7,4, durante um período de 12 a 16 h, sob agitação, a 4° C, para a completa retirada da glicina e reversão do pH.

Após o término da diálise, as soluções contendo os anticorpos purificados anti peptídeos sintéticos foram identificadas e armazenadas em freezer, a -80° C.

#### 4.3 CONJUGAÇÃO DOS ANTICORPOS À *HORSERADISH PEROXIDASE*

Os anticorpos policlonais anti rhGH recolhidos das colunas de afinidade, ou seja, aqueles que não reconheceram os peptídeos sintéticos correspondentes ao *loop* 1 ou à hélice 4, foram conjugados à *Horseradish Peroxidase* (HP) através do método da oxidação do periodato de sódio (NAKANE; PIERCE, 1966; NAKANE; KAWOI, 1974).

A preparação do conjugado com os anticorpos que não reconheceram os peptídeos correspondentes ao sítio 1 do GH de ligação ao receptor, foi a maneira encontrada de se diminuir a possibilidade de haver reação cruzada, isto é, de se evitar que o anticorpo conjugado (2.º anticorpo) reconhecesse os mesmos epítomos que os anticorpos de “captura” (1.º anticorpo) anti peptídeo sintético (*loop* 1 ou hélice 4).

Anteriormente à conjugação, a solução contendo os anticorpos foi submetida ao doseamento de proteínas pelo método de Bradford utilizando-se o reagente *Rio-Rad Protein Assay*, gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Sílvio Sanches com o objetivo de se verificar quantas vezes a solução necessitaria ser concentrada para que a concentração das IgGs alcançasse o valor exigido pelo procedimento da conjugação (1 mg/ml).

A conjugação à HP é um processo desenvolvido em várias etapas que se estendem durante uma semana devido às constantes diálises (12 a 16 h), conforme descrito no protocolo a seguir:



### Etapa 1: Concentração das Imunoglobulinas (IgGs)

1. As soluções contendo as IgGs anti rhGH foram descongeladas à temperatura ambiente e colocadas em membranas de diálise, e estas, em presença de polietilenoglicol com peso molecular de 12.000 a 15.000, foram colocadas à temperatura de 4° C, até haver diminuição do volume e, conseqüentemente, aumento da concentração dos anticorpos a um valor dentro do estipulado pelo protocolo da conjugação (1 mg/ml).

### Etapa 2: Diálise e quantificação das IgGs

1. Após a concentração das IgGs em polietilenoglicol, os anticorpos foram dialisados em 2 L de tampão carbonato/bicarbonato 0,5 M, pH 9,5 ± 0,2, por um período de 12 a 16 horas, a 4° C, sob agitação;
2. Após a diálise, não houve necessidade de centrifugar a solução, porque não houve formação de grumos. Dessa forma, uma alíquota dessa solução foi separada para se proceder ao doseamento de proteínas.

### Etapa 3: Preparo da *Horseradish Peroxidase*

1. Calculou-se o quanto de HP que seria necessário para conjugar a quantidade de anticorpos existentes na solução, seguindo a proporção de 10 mg de HP para cada 20 mg de IgGs;
2. A HP foi diluída em 1 ml de água destilada e colocada em local ao abrigo da luz, envolvendo-se o frasco com papel alumínio;
3. Preparou-se o periodato de sódio (NaOI<sub>4</sub>) 0,1 M no momento do uso, o qual foi adicionado à HP na proporção de 200 µl de periodato de sódio

0,1 M para cada 10 mg de HP. A coloração da solução de HP foi convertida de amarelo para verde;

4. A solução foi mantida sob leve agitação em *shaker* por aproximadamente 30 minutos à temperatura ambiente, com o frasco envolvido em papel alumínio;
5. Dialisou-se a solução contra tampão carbonato/bicarbonato 0,2 M, pH  $9,6 \pm 0,2$ , a  $4^{\circ}$  C, sob agitação, durante um período de 12 a 16 horas e na ausência da luz, ou seja, envolvendo o béquer em papel alumínio.

#### Etapa 4: Adição da *Horseradish Peroxidase* às IgGs

1. A solução com HP foi adicionada à solução de IgGs em tubo revestido por papel alumínio;
2. A solução foi agitada lentamente por 3 horas em *shaker*, à temperatura ambiente e, posteriormente, por um período de 12 a 16 horas, a  $4^{\circ}$  C.

#### Etapa 5: Adição do Borohidreto de Sódio ( $\text{NaBH}_4$ )

1. Adicionou-se borohidreto de sódio recém-preparado em concentração de 4 mg/ml de água destilada, na proporção de 100  $\mu\text{l}$  para 20 mg de HP;
2. Esta mistura foi agitada manualmente, de 20 em 20 min, a  $4^{\circ}$  C, até o término da reação (previsto para 2 a 3 horas após o início da reação);
3. O conjugado foi dialisado em tampão borato, pH 7,4, por 12 a 16 horas, a  $4^{\circ}$  C. Formou-se um pequeno precipitado, o qual foi removido por centrifugação.

#### Etapa 6: Adição do Timerosal 0,01% e da Albumina 1%

No dia seguinte à última diálise, adicionaram-se timerosal a 0,01% e albumina a 1% para conservação do conjugado, e foram preparadas alíquotas de 50 µl que foram armazenadas em ultra-freezer (NIELSEN, 1995).

#### 4.4 PADRONIZAÇÃO DO ELISA SANDUÍCHE

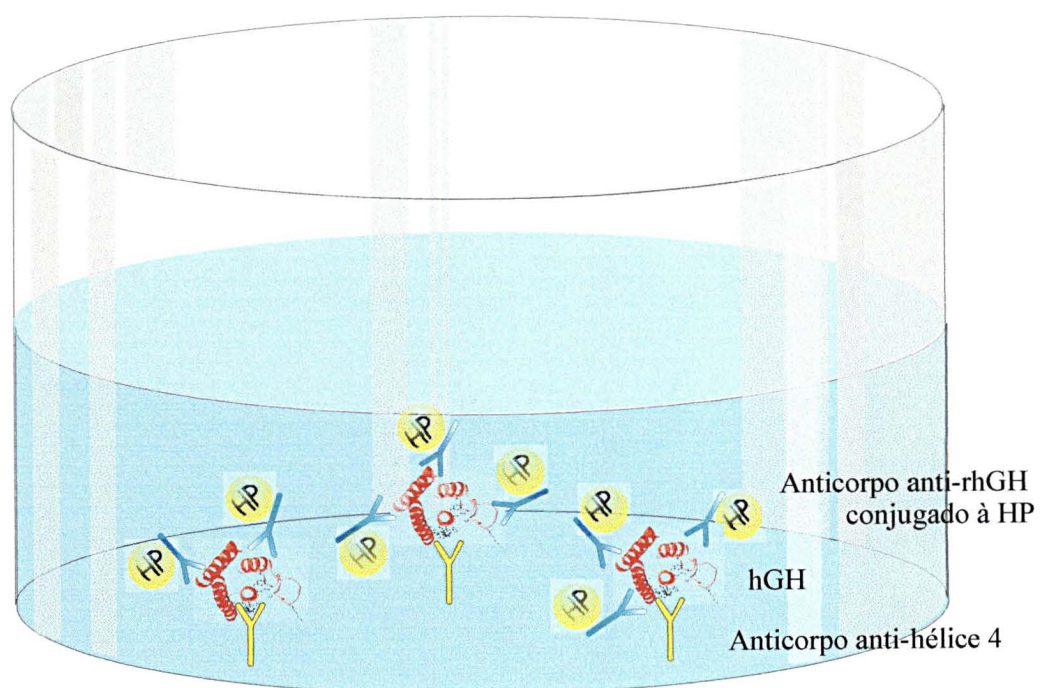
Os anticorpos produzidos e purificados através das colunas de afinidade foram empregados na padronização do ELISA sanduíche (BISHOP, 2000).

Como anticorpos de captura, foram utilizadas somente as imunoglobulinas anti-hélice 4, uma vez que não foi possível obter a quantidade ideal do anticorpo anti *loop* 1. Empregou-se, como anticorpo de marcação, o policlonal anti-rhGH conjugado à *Horseradish Peroxidase* em duplicatas, conforme descrito abaixo.

1. Noventa e seis poços de uma placa de poliestireno foram sensibilizados durante um período que variou entre 12 e 16 horas, a 4° C, com 100 µl (volume padrão) de solução, contendo aproximadamente 1 µg (por poço) do primeiro anticorpo de captura anti-hélice 4, dissolvido em tampão carbonato 0,05 M, pH 9,6 (*Coating Buffer*);
2. No dia seguinte, a placa foi retirada da geladeira e lavada duas vezes com solução de lavagem (salina com Tween a 0,05%) para a retirada do anticorpo que não aderiu à fase sólida;
3. Foram adicionados à placa, 100 µl de uma solução de caseína a 2% em PBS 0,05 M, pH 7,4, denominada de solução de bloqueio, com o objetivo de preencher os sítios dos poços onde não houve aderência do anticorpo. A placa foi levada à estufa, por 1 hora, a 37° C;

4. Após a incubação, a placa foi lavada por duas vezes com solução de lavagem, sendo retirado, por inversão, em papel absorvente, todo e qualquer volume que, por ventura, tivesse permanecido;
5. Com exceção da primeira coluna (branco), cuja pipetagem foi de 100 µl de tampão de incubação (PBS 0,05 M, pH 7,4, 0,25% de caseína, Tween 20 a 0,05%), iniciou-se uma diluição seriada de cima para baixo, iniciada com 125 ng/ml e finalizada com 0,98 ng/ml de rhGH. A placa foi levada novamente para a incubação, durante 1 h, a 37° C;
6. Por inversão, retirou-se todo o volume dos poços que foram lavados por duas vezes. Diluições seriadas do conjugado foram feitas em duplicatas da esquerda para a direita de 1:250 a 1:8.000. A placa foi incubada mais uma vez, a 37° C, por 1 hora;
7. Após esta última incubação, lavou-se a placa pelo menos 6 vezes para completa retirada do conjugado. A seguir, a atividade enzimática do conjugado foi revelada em presença de 100 µl de uma solução de orto-fenilenodiamina (OPD) em concentração de 0,33 mg/ml diluída em tampão citrato 0,5 M, pH 5,2, e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 0,04%. A placa foi deixada em repouso em local escuro, à temperatura ambiente, por 15 minutos;
8. Passados os 15 minutos, a reação foi interrompida pela adição de 20 µl de ácido sulfúrico concentrado em diluição 1:20.
9. A leitura da absorbância foi feita a um comprimento de onda de 490 nm e de 620 nm.

FIGURA 9 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO ELISA SANDUÍCHE



## 4.5 AMOSTRAS

### 4.5.1 Soro dos pacientes

Rotineiramente, o endocrinopediatra do Hospital de Clínicas da UFPR (e da maioria dos outros serviços de endocrinologia) requisita o teste de estímulo para GH, utilizando-se insulina (hipoglicemiante) ou clonidina ( $\alpha_2$ -adrenérgico) de pacientes em investigação de deficiência de crescimento.

Seguindo o protocolo do ambulatório de Endocrinologia Pediátrica do Hospital de Clínicas da UFPR, amostras de sangue de pacientes são colhidas em quatro tempos: Basal (amostra anterior à injeção de clonidina), 60, 90 e 120 minutos após a administração do medicamento. Para testes em que se utiliza insulina, os tempos são normalmente: Basal, 30', 60', 90' e 120'. Estas amostras são, então, encaminhadas ao Laboratório de Medicina Nuclear do Hospital de Clínicas da UFPR, cujo método de análise utilizado é o ensaio imunorradiométrico (IRMA) constituído por uma mistura de dois anticorpos monoclonais.

Sob aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital de Clínicas da UFPR (Anexo 1), após a utilização das amostras pelo Laboratório de Medicina Nuclear, alíquotas do teste de estímulo de 109 pacientes (36 meninas e 73 meninos com idades de  $10,1 \pm 3,2$  e  $10,9 \pm 3,0$  anos, respectivamente) foram armazenadas no Laboratório de Endocrinologia e Genética Molecular em freezer, a  $-20^\circ \text{C}$ , adequadamente identificadas com as iniciais e o registro geral do paciente, data e respectivos intervalos de coleta do teste de estímulo.

### 4.5.2 *Pool* de soros

Para que fosse possível a realização de alguns experimentos da validação do ELISA sanduíche anti-hélice 4, um *pool* de soros, não tratado, foi armazenado a partir das amostras do soro de pacientes submetidos ao teste de estímulo da clonidina.

O *pool* não foi tratado com conservantes e foi feito misturando-se pequenas alíquotas de cada um dos intervalos do teste de estímulo para GH, ou seja, Basal, 60, 90 e 120 minutos. A intenção foi de utilizá-lo como controle nos ensaios imunoenzimáticos, sendo cada tempo analisado em duplicata. Parte deste *pool* foi utilizada para a avaliação da reprodutibilidade e da exatidão do ensaio.

## 4.6 CARACTERÍSTICAS DO ENSAIO

Algumas características do ELISA sanduíche foram avaliadas através de experimentos baseados na revisão em BISHOP, 2000 (itens 4.6.1 a 4.6.5).

### 4.6.1 Determinação da faixa de linearidade

A faixa de linearidade do ELISA sanduíche anti-hélice 4 foi determinada utilizando-se uma diluição seriada da curva padrão com concentrações conhecidas de rhGH que variaram de 500 ng/ml a valores próximos de zero (0,00012 ng/ml). Esta faixa foi ampliada além dos limites escolhidos na padronização anterior (125 a 0,98 ng/ml, item 4.4).

O objetivo foi o de verificar em qual concentração começaria haver saturação do primeiro anticorpo e, conseqüentemente, qual a faixa de linearidade do ensaio.

### 4.6.2 Determinação da sensibilidade

A sensibilidade do ensaio foi obtida através da avaliação de sua eficiência em detectar a menor concentração de rhGH, cuja absorbância é estatisticamente diferente do branco.

Atualmente existem ELISAs para determinações de hGH, direcionados à pesquisa, com valores de sensibilidade da ordem de picogramas, porém, para

laboratórios de rotina, sua aplicação está acima das necessidades reais para diagnóstico de GHD.

Optou-se por testar a sensibilidade do ensaio, comparando-se a absorbância do branco com a leitura de concentrações derivadas da diluição seriada da curva padrão descrita no item 4.6.1. Os resultados foram analisados através do teste *t* de *Student* para se verificar qual a concentração, cuja absorbância apresentava-se com diferença estatisticamente significativa em relação à leitura do branco.

#### 4.6.3 Precisão

A reprodutibilidade do ensaio foi avaliada através dos coeficientes de variação intra e interensaio utilizando-se os valores encontrados na quantificação do hGH presente nos *pools* de soros.

O coeficiente de variação interensaio foi calculado utilizando-se a média e o desvio padrão de 17 análises realizadas para cada um dos intervalos, ou seja, Basal, 60', 90' e 120', em diferentes ocasiões. Os cálculos utilizados para a obtenção do coeficiente de variação intra-ensaio basearam-se nos valores de 16 replicatas de cada tempo obtidos de uma mesma placa.

#### 4.6.4 Exatidão

##### 4.6.4.1 Recuperação

A exatidão do ensaio foi avaliada através dos resultados obtidos com o experimento da recuperação do rhGH, cuja função é verificar se um método determina toda a substância encontrada em uma amostra ou somente parte dela. Um ensaio está dentro dos padrões de qualidade quando apresenta valores de recuperação entre 95 e



105%, levando-se em consideração que a variação de  $\pm 5\%$  corresponde ao erro intrínseco do método.

A recuperação consiste na comparação entre os resultados obtidos antes e depois da adição de uma pequena alíquota do padrão concentrado na amostra a ser quantificada, não podendo esta alíquota exceder 10% do volume final (BISHOP, 2000).

Para este experimento utilizaram-se o *pool* de soros e um padrão concentrado de rhGH com 100 ng/ml. A fim de que o volume adicionado à amostra não ultrapassasse o limite de 10  $\mu$ l, adicionaram-se 7  $\mu$ l do padrão totalizando, portanto, o volume final de 107  $\mu$ l por poço.

Após a quantificação da concentração de hGH em cada intervalo do teste de estímulo, calculou-se a quantidade de rhGH que poderia ser adicionada à amostra, a fim de que o resultado permanecesse dentro da faixa de linearidade do método, como exposto no quadro 4.

QUADRO 4 - DEMONSTRAÇÃO DOS DADOS DA RECUPERAÇÃO

Amostra	Basal	60'	90'	120'
hGH (ng/ml)	2,76	8,94	14,08	7,52
rhGH adicionado (ng/ml)	6,54	6,54	6,54	6,54
Volume final ( $\mu$ l)	107	107	107	107

#### 4.6.4.2 Cálculos da recuperação

EQUAÇÃO 1- Cálculo do volume do padrão a ser adicionado

$$CA = CP \times \frac{VP}{VP + VA}$$

EQUAÇÃO 2 – Cálculo da concentração recuperada

$$CR = \text{concentração pós-adição} - \text{concentração pré-adição}$$

## EQUAÇÃO 3 – Cálculo da porcentagem recuperada

$\text{Porcentagem da recuperação} = \frac{\text{CR}}{\text{CA}} \times 100$
------------------------------------------------------------------------------

Onde: CA = concentração adicionada

CP = concentração do padrão

VP = volume do padrão

VA = volume da amostra

CR = concentração recuperada

#### 4.6.4.3 Linearidade do soro

Para se verificar a linearidade do soro, ou seja, se a diluição do soro afetaria o desempenho do ensaio, amostras de cada um dos quatro tempos do teste de estímulo de um dos pacientes foram diluídas com soro de ovelha nas proporções de 1:2, 1:4, 1:8 e 1:16 e aplicadas à placa em duplicatas. É necessário enfatizar que o GH do animal presente no soro não foi reconhecido pelo anticorpo anti-hélice 4.

#### 4.6.5 Especificidade

A pesquisa de uma possível reação cruzada com a prolactina humana (hPRL) foi necessária devido a existência de alguns aminoácidos em comum entre a molécula da prolactina e os peptídeos sintéticos correspondentes à hélice 4 do sítio 1 do hGH e ainda, porque as concentrações séricas de PRL se alteram em crianças com neoplasias ou sob outras formas de estresse (BOLE-FEYSOT *et al.*, 1998).

O ensaio para a verificação de reações cruzadas com a hPRL seguiu o protocolo do ELISA sanduíche. Foi realizado um experimento utilizando antígenos de origens diferentes, sendo o primeiro deles o peptídeo liofilizado extraído da pituitária humana e o segundo, um padrão de prolactina da *Abbott Laboratories* utilizado em exames de rotina do Laboratório de Medicina Nuclear do Hospital de Clínicas da UFPR.

Neste experimento, nas colunas 2 a 6 empregou-se como antígeno a diluição seriada do rhGH em concentração inicial de 125 ng/ml e final de 0,98 ng/ml. Adicionaram-se diluições seriadas da hPRL da *Sigma* nas colunas 7, 8 e 9 em concentração inicial de 500 ng/ml e final de 3,90 ng/ml. O padrão de hPRL da *Abbott*, gentilmente fornecido pelo laboratório de Medicina Nuclear do Hospital de Clínicas da UFPR, foi adicionado nas colunas 10, 11 e 12 em concentrações que variaram de 200 a 1,56 ng/ml.

Na coluna 1, o antígeno não foi adicionado, caracterizando, portanto, o branco.

#### 4.7 APLICAÇÃO DO ELISA SANDUÍCHE ANTI-HÉLICE 4

##### 4.7.1 Padronização do volume de soro

Após a padronização do ELISA para o sítio 1, iniciou-se a determinação da concentração do GH sérico em pacientes em investigação sobre deficiência do crescimento.

Foi verificado qual a quantidade de soro dos pacientes seria ideal e conseqüentemente, qual o volume final da solução em cada poço. Inicialmente foram comparados os resultados de ensaios utilizando-se o soro em diversas situações como, por exemplo, sem tamponamento e em várias diluições em tampão de incubação.

As determinações foram reproduzidas com menor variação com 100 µl de soro humano mais 100 µl de tampão de incubação, conseqüentemente o volume final para cada poço passou de 100 µl para 200 µl, incluindo todas as etapas anteriores e posteriores à incubação do antígeno.

Entretanto foi estabelecido que, quando o resultado obtido apresentar valores acima da linearidade do método (31,25 ng/ml), é necessário uma segunda ou até mesmo uma terceira determinação utilizando-se 25 ou 50 µl de soro humano por poço e, como conseqüência, 175 ou 150 µl de tampão de incubação, respectivamente.

#### 4.7.2 Otimização do tempo de execução

Após a padronização e identificação das características do ELISA sanduíche anti-hélice 4, investigou-se um modo de otimizar o tempo de execução do ensaio.

Verificou-se que placas pré-incubadas com o 1.º anticorpo, lavadas, bloqueadas com caseína e congeladas apresentavam os mesmos resultados que as placas preparadas convencionalmente sem congelamento. Dessa forma, o tempo de execução do ELISA passou de 4 horas para 2 horas e 45 minutos.

Várias placas foram incubadas, bloqueadas e congeladas, como descrito abaixo:

1. Poços de vinte placas de poliestireno foram sensibilizados durante um período que variou entre 12 e 16 horas, a 4° C, com 200 µl (volume padrão) de solução, contendo aproximadamente 1 µg (por poço) do primeiro anticorpo de captura anti-hélice 4 dissolvido em tampão carbonato 0,05 M, pH 9,6 (*Coating Buffer*);
2. No dia seguinte, as placas foram retiradas da geladeira, lavadas com solução de lavagem (salina com Tween a 0,05%) e incubadas com solução de caseína a 2% (bloqueio) em PBS 0,05 M, pH 7,4 por 1 hora, a 37° C;
3. Após serem bloqueadas, as placas foram lavadas, invertidas sobre papel absorvente para completa retirada da solução de lavagem e congeladas a – 20° C, para serem utilizadas durante a semana.

#### 4.7.3 Quantificação do hGH sérico de crianças

O ELISA anti-hélice 4 foi empregado para a quantificação do hGH das crianças submetidas ao teste de estímulo da clonidina, seguindo o protocolo descrito a seguir:

1. Após retirar do freezer, a placa pré-incubada e bloqueada, os poços foram lavados com solução de lavagem por duas vezes, e a placa foi invertida sobre papel absorvente;
2. Nas três primeiras colunas, iniciou-se diluição seriada do rhGH, de cima para baixo, em 200 µl de tampão de incubação (TI) com concentração inicial de 125 ng/ml e final com 0,98 ng/ml. Nas colunas, de 4 a 11, foram pipetados 100 µl de soro de cada tempo do teste de estímulo de 9 pacientes (em duplicata) diluídos em 100 µl de TI. Da mesma forma foram incubados os soros controle (*pool*) na última coluna. A placa foi incubada durante 1 h, a 37° C;
3. Por inversão, retirou-se todo o volume dos poços, os quais foram lavados por duas vezes com solução de lavagem. A seguir, foram pipetados 200 µl do anticorpo anti-rhGH conjugado à *Horseradish Peroxidase* 1:1.000 em TI. A placa foi incubada novamente a 37° C, por 1 hora;
4. Após esta última incubação, lavou-se a placa pelo menos 6 vezes para total retirada do conjugado. A seguir, a atividade enzimática do conjugado foi revelada em presença de 200 µl de uma solução de OPD em concentração de 0,33 mg/ml diluída em tampão citrato 0,5 M, pH 5,2, e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a 0,04%. A placa foi deixada em local escuro à temperatura ambiente por 15 minutos;

5. Passados os 15 minutos, a reação foi interrompida com a adição de 20  $\mu$ l de ácido sulfúrico concentrado 1:20.
6. A leitura da absorbância foi feita sob comprimento de onda de 490 nm e de 620 nm em leitora de ELISA *Bio Tek EL<sub>x</sub> 800*.

Após a leitura, as médias das absorbâncias obtidas com a curva padrão em função das concentrações correspondentes foram plotadas em um gráfico para compor a curva padrão do ensaio. A faixa de linearidade permitiu o cálculo das concentrações desconhecidas de hGH dos soros dos pacientes, assim como das amostras controle.

Os cálculos para a quantificação do hGH foram realizados a partir da média das absorbâncias das duplicatas de cada tempo do teste de estímulo.

#### 4.8 COMPARAÇÕES ENTRE OS ENSAIOS

Os resultados obtidos com o ELISA sanduíche foram comparados aos do IRMA MAIACLONE<sup>®</sup> empregado pelo Hospital de Clínicas da UFPR.

Vinte e quatro pacientes, cujas quantificações apresentaram valores discrepantes entre estes dois ensaios e que ainda tinham soro suficiente para uma terceira determinação, foram submetidos ao ensaio quimioluminométrico (ICMA) do sistema automatizado IMMULITE 2000 do Laboratório Frischmann Aisengart.

#### 4.8.1 Características do IRMA

O ensaio imunorradiométrico utilizado pelo Laboratório de Medicina Nuclear para a determinação quantitativa de hGH sérico é produzido pela BIODATA e é importado da Itália pelo Hospital de Clínicas. Segundo o manual que o acompanha (BIODATA DIAGNOSTICS, 1998), o *kit* MAIACLONE<sup>®</sup> é constituído por uma mistura de dois anticorpos monoclonais anti-hGH que reconhecem epítomos diferentes e um terceiro anticorpo anti-fluoresceína conjugado a partículas magnéticas.

Inicialmente, a amostra é incubada, por uma hora a 37° C, com uma mistura dos anticorpos monoclonais, sendo o primeiro marcado com <sup>125</sup>I e o segundo conjugado à fluoresceína para que haja a formação de um sanduíche. A seguir, é adicionado o anticorpo anti fluoresceína ligado a partículas magnéticas (fase sólida). Após cinco minutos de incubação, à temperatura ambiente, os tubos são colocados sobre uma *rack* magnética para que o complexo decante. Passados mais cinco minutos, esta *rack* é invertida para a remoção do anticorpo não ligado.

A solução de lavagem é adicionada aos tubos. Após agitação de cada um dos tubos com *vortex*, eles são novamente encaixados na *rack* magnética para decantação e inversão dos tubos. A leitura é feita em contador gama, calibrado para detectar <sup>125</sup>I.

A concentração de GH no padrão e na amostra do paciente é diretamente proporcional à radioatividade do complexo formado. A concentração máxima de hGH quantificável, sem haver diluição, é de 38,46 ng/ml ou 100 mUI/l e a sensibilidade do ensaio é de 0,015 ng/ml (0,04 mUI/l). O coeficiente de variação interensaio é de 2,38 e 2,87 % para valores de 1,2 e 18,15 ng/ml, enquanto o coeficiente de variação intra-ensaio é de 2,17 e 2,54 % para estas mesmas concentrações, respectivamente.

Os valores da recuperação do rhGH adicionado variam de 95,1 a 110,5 %. Na verificação da linearidade após diluições seriadas, os resultados são de 110,2 % para diluição 1:2 e de 88,6% para 1:16.

O IRMA MAIACLONE<sup>®</sup> apresenta 0,1% de reação cruzada com a hPRL e 0,0056% com o hPL.

#### 4.8.2 Características do ICMA

O ensaio quimioluminométrico (ICMA) para a determinação de GH utilizado pelo Laboratório Frischmann Aisengart, faz parte do sistema automatizado IMMULITE 2000®.

O *kit* é constituído por esferas, de material não divulgado pelo manual que o acompanha (DIAGNOSTIC PRODUCTS CORPORATION, 2001), revestidas com anticorpo monoclonal anti-hGH de hibridomas produzidos a partir de linfócitos de camundongo e pelo conjugado composto de anticorpo policlonal de coelho anti-hGH marcado com fosfatase alcalina de intestino de bezerro.

O tempo de execução é de 30 minutos, e o volume de soro empregado pelo equipamento para realização do ensaio é de 25 µl, embora a quantidade mínima de soro necessária seja de 400 µl, para que haja preenchimento do denominado “espaço morto” do equipamento.

O limite de detecção máximo do ICMA é de 40 ng/ml (104 mUI/l), e a sensibilidade analítica é da ordem de 0,01 ng/ml (0,026 mUI/l).

De acordo com o manual do ensaio, o efeito “gancho” acontece somente com concentrações acima de 17.000 ng/ml (44200 mUI/l).

O coeficiente de variação interensaio do ICMA é de 6,5 e 6,6% para valores de 2,6 e 17,0 ng/ml, e o coeficiente de variação intra-ensaio é de 3,5 e 4,2% para as mesmas concentrações.

Os valores da recuperação do rhGH adicionado variam de 90 a 104%. Com diluições seriadas, a linearidade do método varia de 103% para diluição 1:2 e 86% para 1:8.

A reação cruzada com a hPRL é de 0,002% e de 0,03% com o hPL.



#### 4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As determinações de hGH no soro de pacientes através do ELISA foram expressas em médias de duas quantificações (duplicatas).

A análise estatística, os cálculos para correlação entre os ensaios, assim como todos os gráficos, foram feitos com o auxílio do *software* Statistica para Windows (Versão STATSOFT, 1996).

Para a comparação entre as médias dos resultados obtidos com o experimento de caracterização da sensibilidade do ensaio, utilizou-se o teste *t* de *Student*.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 OBTENÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS ANTI-rhGH

#### 5.1.1 Confirmação da imunização

##### 5.1.1.1 Imunodifusão

No dia seguinte à incubação do soro nas placas de imunodifusão, verificou-se um halo de opacificação no ágar (formato meia lua) apenas nos poços correspondentes às diluições 1:1, 1:2 e 1:4, indicando imunização adequada do animal após a 5.<sup>a</sup> injeção do antígeno.

##### 5.1.1.2 ELISA indireto

Com o ELISA indireto, foi possível a determinação dos títulos dos anticorpos anti-rhGH da égua após a 7.<sup>a</sup> imunização.

Obteve-se a absorbância de 2.375 para a diluição 1:2.000, e de 0,150 para a diluição 1:256.000, enquanto o soro pré-imunização apresentou uma absorbância de 0,038, comprovando, portanto, a excelente imunização do animal.

Para aumentar estes títulos, o animal foi imunizado com mais uma dose do antígeno antes da coleta dos 3 litros de sangue, dos quais retirou-se o soro para extração das imunoglobulinas.

## 5.2 PURIFICAÇÃO DOS ANTICORPOS

### 5.2.1 Síntese dos peptídeos

Os peptídeos correspondentes às seqüências do *loop* 1 e hélice 4 utilizados na montagem das colunas de afinidade apresentaram respectivamente 80 e 90% de pureza de acordo com os perfis de HPLC e espectros de massa, os quais foram analisados pela Dra. Maria Aparecida Juliano, da equipe do Dr. Luiz Juliano Neto do Departamento de Biofísica da Universidade Federal de São Paulo.

### 5.2.2 Colunas de afinidade

#### 5.2.2.1 Percentual de ligação do rhGH e dos peptídeos sintéticos à *Sepharose*<sup>®</sup>

A leitura da absorbância da solução de rhGH inicial adicionada à *Sepharose*<sup>®</sup> foi de 17,36, ao passo que a leitura obtida com o sobrenadante do gel de *Sepharose*<sup>®</sup> foi de apenas 1,27. De acordo com estes resultados, a porcentagem de rhGH que não se ligou à *Sepharose*<sup>®</sup> foi apenas 7,31%. Portanto a porcentagem de rhGH conjugado à *Sepharose*<sup>®</sup> foi 92,69%, ou seja, dos 21,8 mg de rhGH utilizados na montagem da coluna, 20,20 mg aderiram à *Sepharose*<sup>®</sup>.

Para as colunas de afinidade do *loop* 1 e hélice 4, os percentuais de ligação dos peptídeos sintéticos foram de 86,78% e de 93,50%, respectivamente.

#### 5.2.2.2 Quantificação das imunoglobulinas

Após a purificação dos anticorpos através das colunas de afinidade, as alíquotas contendo imunoglobulinas purificadas foram concentradas, utilizando-se polietilenoglicol.

Os anticorpos policlonais anti-rhGH apresentaram concentração de 1,6 mg/ml, ao passo que os valores encontrados para os anticorpos anti-hélice 4 foram de 0,948 mg/ml.

Para os anticorpos anti *loop* 1, verificou-se que, mesmo após uma segunda concentração com polietilenoglicol, os anticorpos recolhidos da coluna de purificação apresentaram concentração de apenas 0,057 mg/ml, valor insuficiente para a padronização do imunoensaio.

### 5.3 PADRONIZAÇÃO DO ELISA SANDUÍCHE

#### 5.3.1 ELISA sanduíche

Na padronização do ELISA sanduíche, utilizaram-se 100 µl do anticorpo purificado anti-hélice 4 como primeiro anticorpo (de “captura”) por placa.

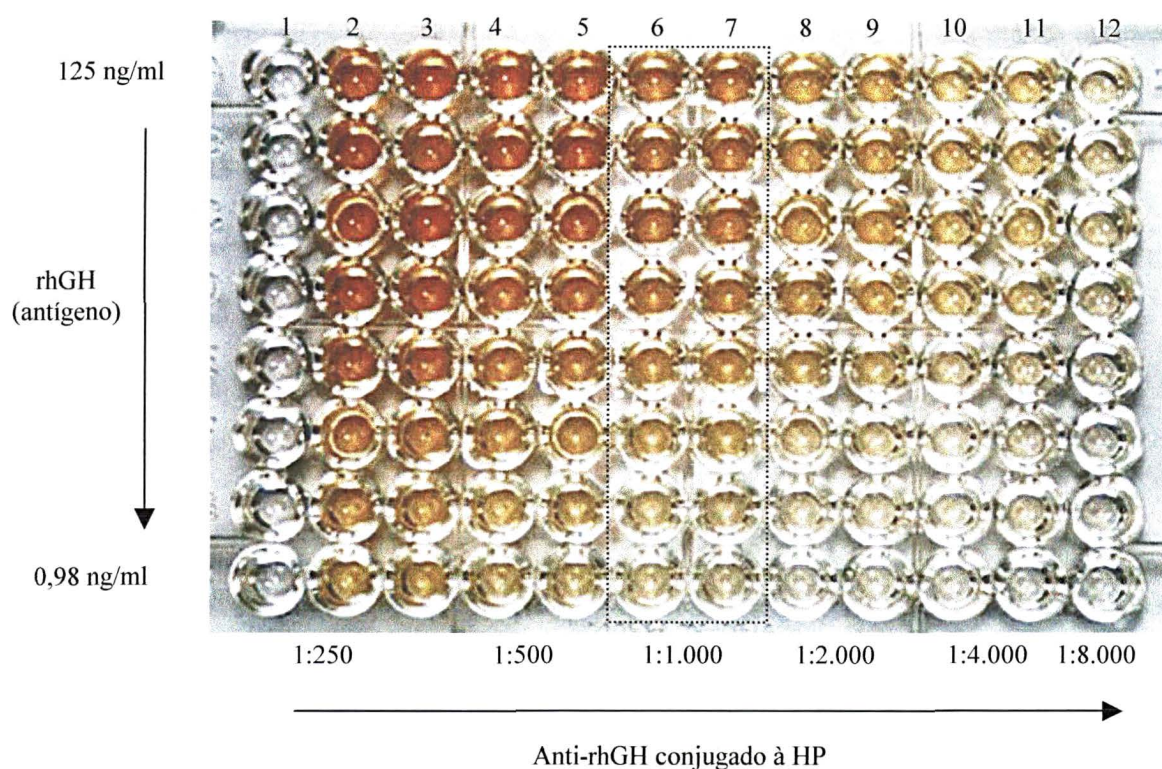
O antígeno, rhGH, foi adicionado em diluição seriada de razão 2, de cima para baixo, em concentração inicial de 125 ng/ml e final de 0,98 ng/ml. O segundo anticorpo conjugado à *Horseradish Peroxidase* foi diluído da esquerda para a direita, em duplicatas com exceção da última diluição, na proporção de 1:250 a 1:8.000, como ilustrado na figura 10.

Não houve coloração inespecífica como pode ser observado na primeira coluna em cujos poços adicionaram-se tampão de incubação sem a adição de rhGH (branco) e o conjugado na diluição de 1:250.

Verificou-se, nos ensaios subseqüentes, que havia saturação do primeiro anticorpo com concentrações do antígeno a partir de 31,25 ng/ml.

Entre as diluições do segundo anticorpo, a diluição 1:1.000 foi considerada ideal devido ao fato de ser a condição em que se observa com melhor nitidez as diferenças de coloração entre as concentrações do antígeno (vide colunas 6 e 7 da figura 10).

FIGURA 10 – PADRONIZAÇÃO DO ELISA SANDUÍCHE



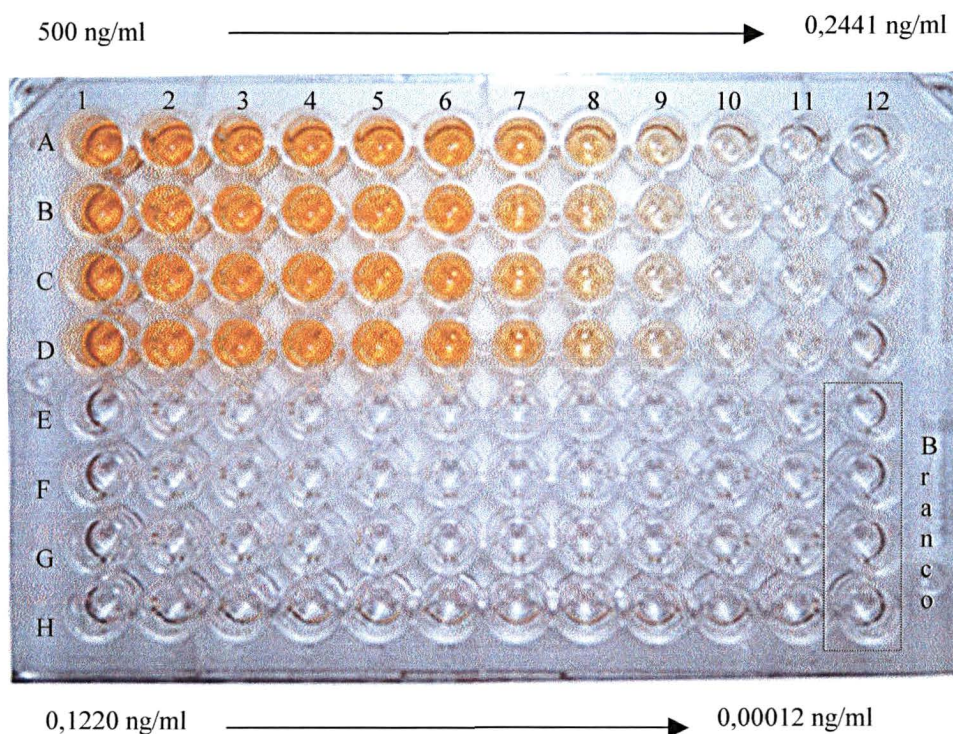
## 5.4 CARACTERÍSTICAS DO ENSAIO

### 5.4.1 Determinação da faixa de linearidade

Diluindo-se a curva padrão do ELISA sanduíche (figura 11) foi possível determinar a faixa de linearidade do método (gráfico 1).

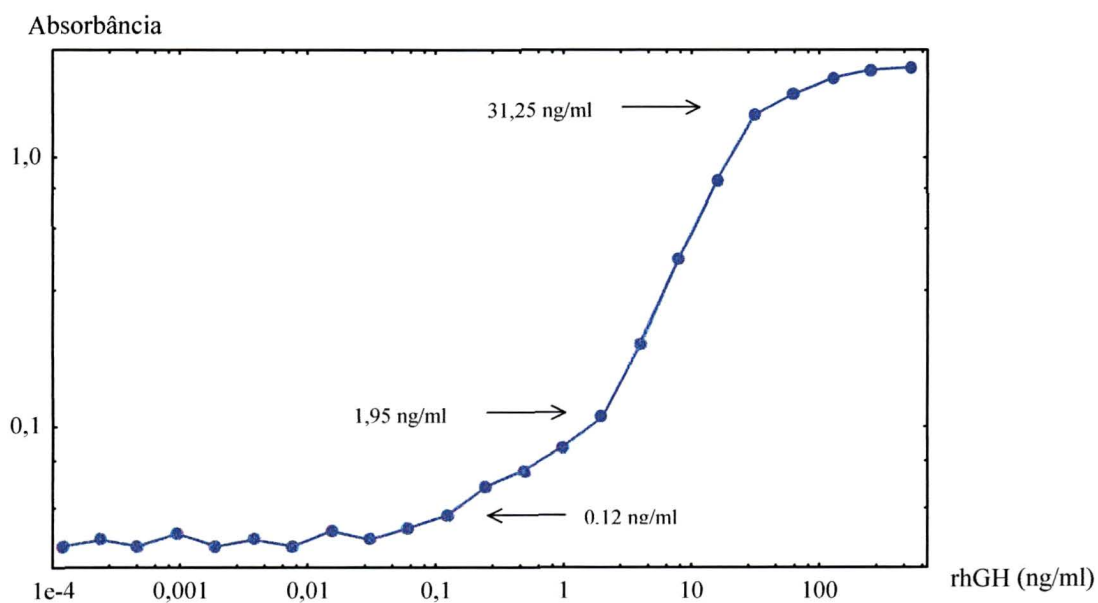
Adicionaram-se à coluna 1 (linhas de A a D), 500 ng/ml de rhGH que foram diluídos da esquerda para a direita, de forma seriada, até a coluna 12 e continuando nas linhas E a H, com concentração final de 0,00012 ng/ml na coluna 11. Na coluna 12 (linhas E a H), adicionou-se somente o tampão de incubação, cuja absorbância foi de 0,036, descrita com “branco” (controle ou absorbância inespecífica).

FIGURA 11 – DILUIÇÃO SERIADA DA CURVA PADRÃO



Como pode ser observado no gráfico 1, a faixa de linearidade do ELISA sanduíche está entre os valores 31,25 ng/ml e 1,95 ng/ml.

GRÁFICO 1 – FAIXA DE LINEARIDADE DO ELISA SANDUÍCHE





#### 5.4.2 Determinação da sensibilidade do ELISA

A sensibilidade do ELISA foi estimada a partir da verificação de uma diferença estatisticamente significativa entre a leitura do branco ( $A = 0,036$ ) e da absorbância da menor concentração ( $A = 0,047$ ) originada da diluição seriada da curva padrão. Assim, a sensibilidade mínima encontrada foi de 0,12 ng/ml, porém este valor pode ser ainda menor, se for considerado que não foram avaliadas concentrações dentro do intervalo existente entre 0,12 ng/ml e a próxima diluição (0,06 ng/ml), cuja leitura foi estatisticamente semelhante ao branco.

TABELA 1 – SENSILIDADE DO ELISA SANDUÍCHE

rhGH (ng/ml)	Média da Absorbância	<i>p</i>
0	0,036	-
0,12	0,047	0,024
0,06	0,042	0,804

NOTA: *p* - diferença entre as absorbâncias do “branco” e das diluições correspondentes às concentrações rhGH, aplicando-se o teste *t* de Student.

#### 5.4.3 Precisão

A reprodutibilidade do ELISA sanduíche anti-hélice 4 foi avaliada através dos coeficientes de variação intra e interensaio, os quais apresentaram valores dentro dos padrões de imunoensaios relatados na literatura. O coeficiente de variação (CV) intra-ensaio apresentou valores entre 4,53 e 6,33%, enquanto o coeficiente interensaio variou entre 6,00 e 8,27% (tabela 2).

TABELA 2 – COEFICIENTES DE VARIAÇÃO INTRA E INTERENSAIO

	n	Média (ng/ml)	DP	CV (%)
<b>Intra-ensaio</b>	16			
Basal		2,37	0,15	6,33
60'		8,16	0,37	4,53
90'		14,62	0,81	5,54
120'		7,54	0,47	6,23
<b>Interensaio</b>	17			
Basal		2,55	0,18	7,06
60'		8,67	0,52	6,00
90'		14,87	1,23	8,27
120'		7,79	0,52	6,67

#### 5.4.4 Exatidão

##### 5.4.4.1 Recuperação

A recuperação é uma ferramenta usualmente utilizada para se determinar o grau de exatidão de um método analítico. Como pode ser observado na tabela 3, a percentagem de recuperação variou entre 96,02 a 103,82% nos diferentes tempos. Deve-se salientar que erros intrínsecos ao método são os responsáveis pelos valores de uma recuperação acima de 100%, sendo tolerável, portanto, uma variação de até  $\pm 5\%$ .

**TABELA 3 - RECUPERAÇÃO DO rhGH ADICIONADO AO SORO HUMANO**

<b>Amostra</b>	<b>Basal</b>	<b>60´</b>	<b>90´</b>	<b>120´</b>
hGH (ng/ml)	2,76	8,94	14,08	7,52
rhGH adicionado (ng/ml)	6,54	6,54	6,54	6,54
Concentração recuperada (ng/ml)	6,28	6,62	6,79	6,45
<b>Recuperação (%)</b>	<b>96,02</b>	<b>101,22</b>	<b>103,82</b>	<b>98,62</b>

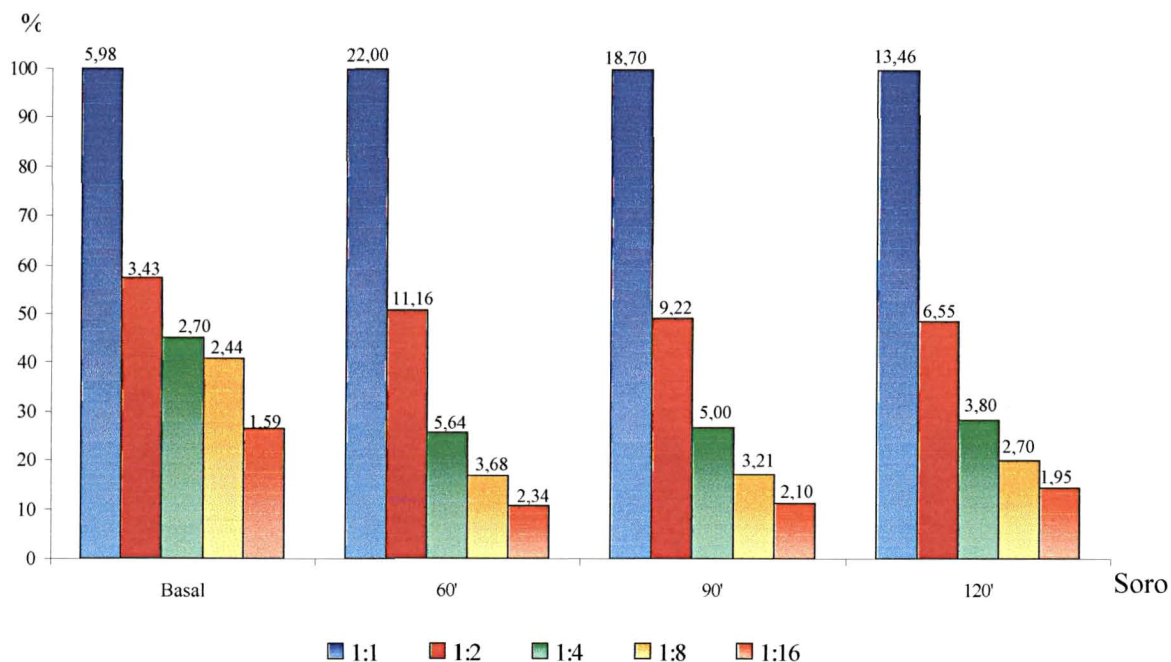
##### 5.4.4.2 Linearidade

Mantendo-se constante o volume de tampão por poço (100  $\mu$ l) e diluindo-se o soro humano com soro de ovelha (gráfico 3), observou-se que, para concentrações de hGH entre 3,37 e 11 ng/ml, houve maior exatidão nas medidas em relação ao esperado (tabela 4), enquanto com soros, cujas concentrações eram menores que 3 ng/ml, o método perdeu a linearidade.

A relação entre o valor observado e o esperado em soros com baixa concentração de hGH, após as diluições, apresentou sobrestimação, como pode ser observado na tabela 4. É necessário enfatizar que o anticorpo anti-hélice 4 não reconhece o GH de ovelha (absorbância igual à do branco) e, portanto, não interferiu no experimento citado.



GRÁFICO 2 – RESULTADOS OBTIDOS COM A DILUIÇÃO DOS SOROS COM SORO DE OVELHA



Diluição seriada dos soros de um paciente utilizando-se soro de ovelha. As concentrações para cada um dos tempos e para cada diluição estão descritas no topo das colunas em ng/ml

TABELA 4 – LINEARIDADE DO SORO HUMANO APÓS A DILUIÇÃO COM SORO DE OVELHA

Soro	Diluição	Observado (ng/ml)	Esperado (ng/ml)	O/E %
Basal	1:1	5,98	-	-
	1:2	3,43	2,99	115
	1:4	2,70	1,50	180
	1:8	2,44	0,75	307
	1:16	1,59	0,37	430
60'	1:1	22,00	-	-
	1:2	11,16	11	101
	1:4	5,64	5,5	102
	1:8	3,68	2,75	134
	1:16	2,34	1,37	171
90'	1:1	18,70	-	-
	1:2	9,22	9,35	99
	1:4	5,00	4,68	107
	1:8	3,21	2,34	137
	1:16	2,10	1,17	179
120'	1:1	13,46	-	-
	1:2	6,55	6,73	97
	1:4	3,80	3,37	112
	1:8	2,70	1,68	161
	1:16	1,95	0,84	232

### 5.4.5 Especificidade

As leituras da absorbância dos poços, cujo antígeno era hPRL ( $\leq 500$  ng/ml), foram semelhantes às do branco (figura 12, coluna 1).

FIGURA 12 – ESPECIFICIDADE DO ANTICORPO ANTI-HÉLICE 4

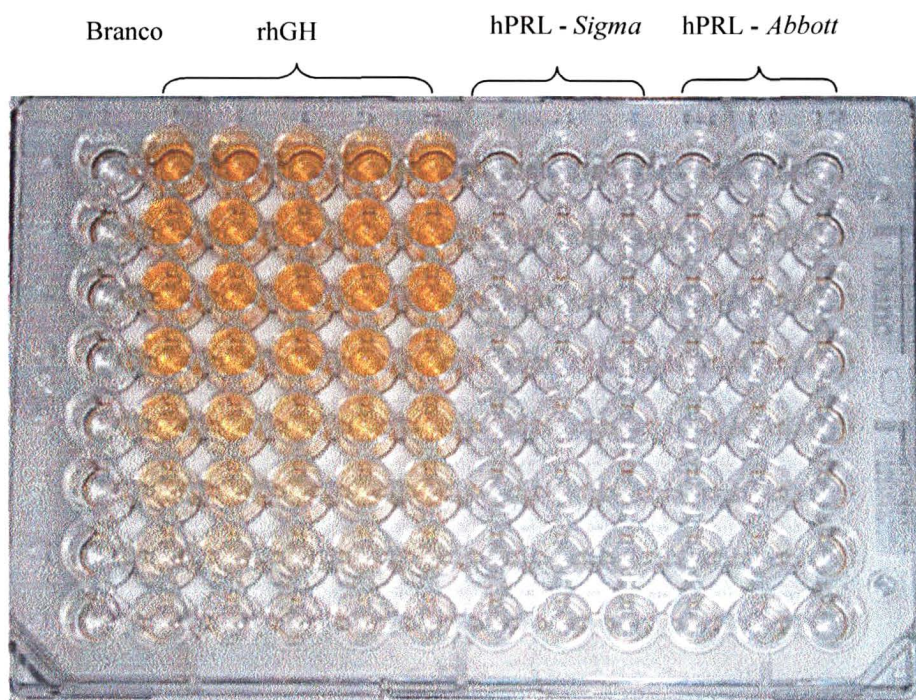
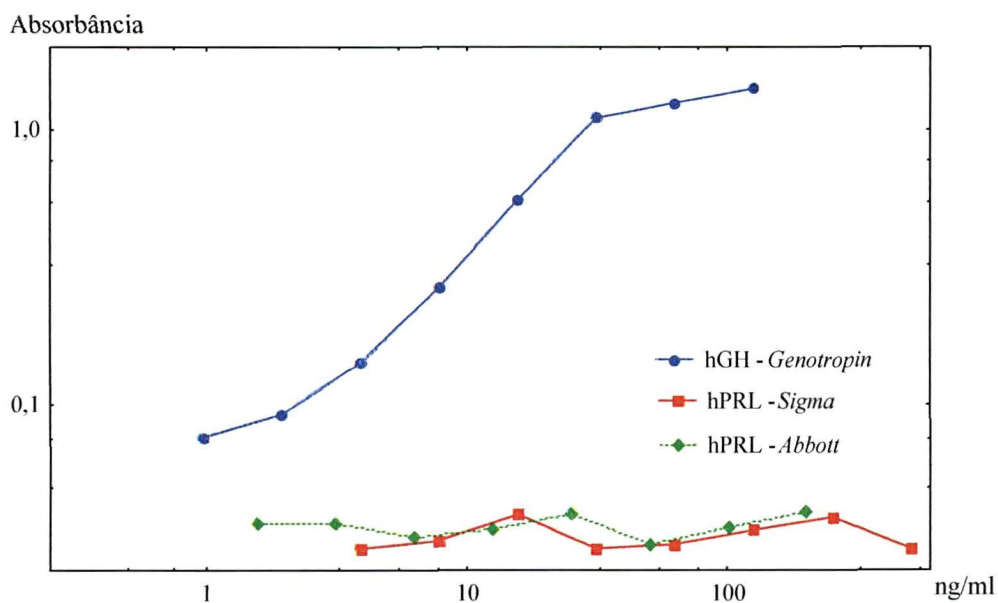


GRÁFICO 3 – ESPECIFICIDADE DO ANTICORPO ANTI-HÉLICE 4



Para ambas as marcas, *Sigma* e *Abbott*, não houve reconhecimento da prolactina humana (hPRL) pelo anticorpo anti-hélice 4, como ilustrado no gráfico 3.

## 5.5 DETERMINAÇÃO DE hGH ATRAVÉS DO ELISA SANDUÍCHE

### 5.5.1 Padronização do volume de soro humano

A melhor reprodutibilidade dos resultados foi obtida com a utilização de 100 µl de soro dos pacientes diluídos em 100 µl de tampão de incubação.

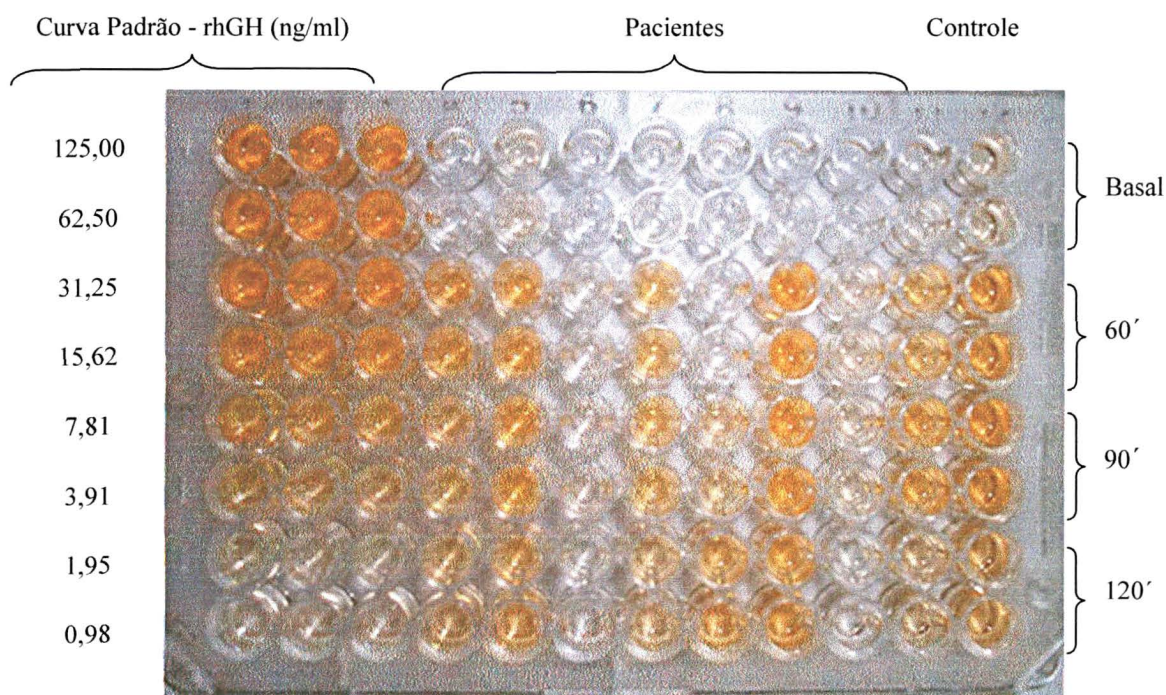
Diluições com maior quantidade de soro do que de tampão foram menos precisas. Maiores diluições de soro causaram discrepâncias nas quantificações de amostras com baixas concentrações de GH. Entretanto soros de pacientes com valores de hGH acima da linearidade do método (31,25 ng/ml) devem ser diluídos de maneira que a concentração final esteja dentro da faixa estabelecida (1,95 a 31,25 ng/ml).

### 5.5.2 Aplicação do ELISA sanduíche na quantificação de hGH

Conforme ilustra a figura 13, a placa típica do ELISA anti-hélice 4 é composta pela diluição seriada da curva padrão do rhGH em triplicata (colunas 1, 2 e 3) com concentração inicial de 125 ng/ml (linha A) e final de 0,98 ng/ml de rhGH (linha H), pelos soros de 8 pacientes (colunas 4 a 11) e pelos soros controle dispostos verticalmente e quantificados em duplicatas. Os soros controle utilizados em cada ensaio (coluna 12 da figura 12), para cada situação (basal ou pós-estímulo) foram obtidos com o *pool* da situação equivalente (basal e amostras de soro coletadas aos 60, 90 e 120 minutos, após o estímulo farmacológico).



FIGURA 13 - ELISA SANDUÍCHE ANTI-HÉLICE 4 PARA DETERMINAÇÃO DO hGH EM PACIENTES SUBMETIDOS AO TESTE DE ESTÍMULO DA CLONIDINA.



## 5.6 COMPARAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS OBTIDOS COM O ELISA SANDUÍCHE E COM O IRMA

Os gráficos 4 a 11 abaixo comparam os resultados de 436 amostras de 109 pacientes nos tempos Basal, 60, 90 e 120 minutos obtidos com o IRMA (MAIACLONE) e o ELISA sanduíche anti-hélice 4.

Como pode ser observado, existe boa correlação entre o IRMA e o ELISA sanduíche verificada através dos coeficientes de correlação que variaram entre 0,92 e 0,98 nos diferentes intervalos do teste de estímulo.

GRÁFICO 4 – CORRELAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS OBTIDOS COM O ELISA SANDUÍCHE E COM O IRMA EM SORO BASAL DE MENINOS

hGH (ng/ml) - ELISA

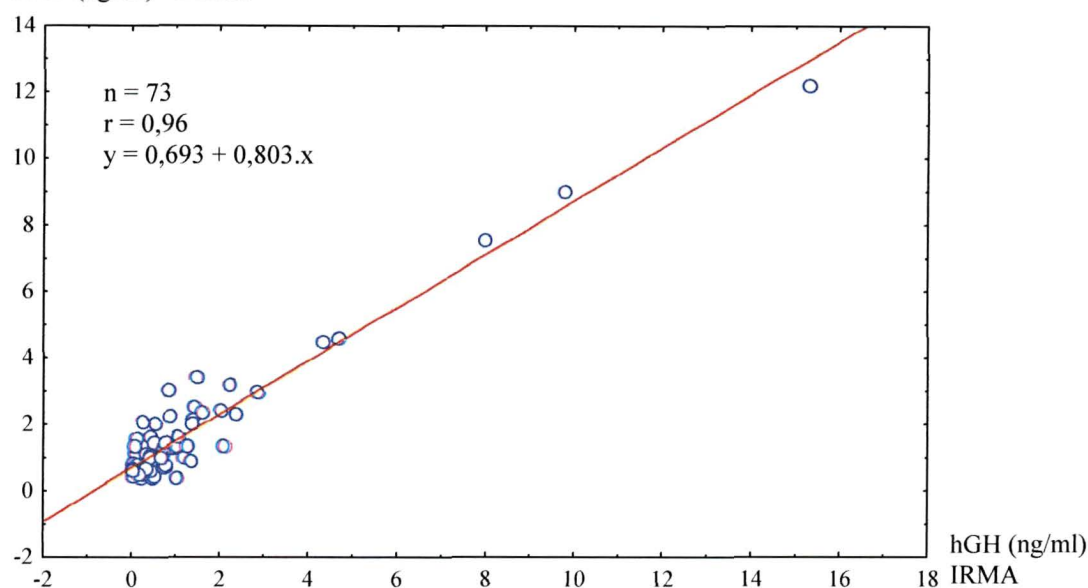


GRÁFICO 5 – CORRELAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS OBTIDOS COM O ELISA SANDUÍCHE E COM O IRMA EM SORO BASAL DE MENINAS

hGH (ng/ml) - ELISA

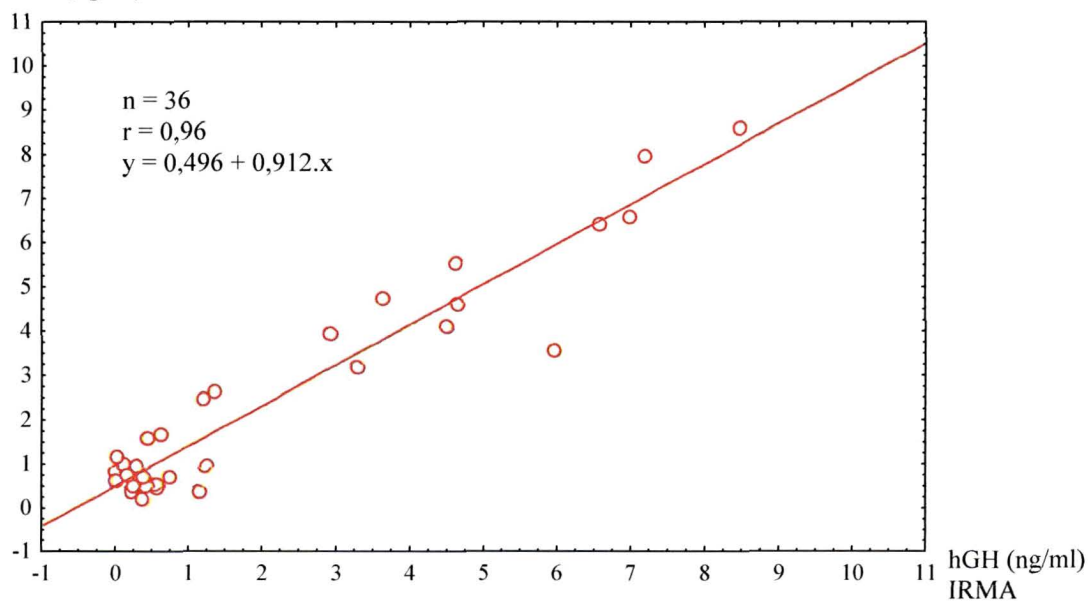


GRÁFICO 6 – CORRELAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS OBTIDOS COM O ELISA SANDUÍCHE E COM O IRMA EM SORO 60' DE MENINOS

hGH (ng/ml) - ELISA

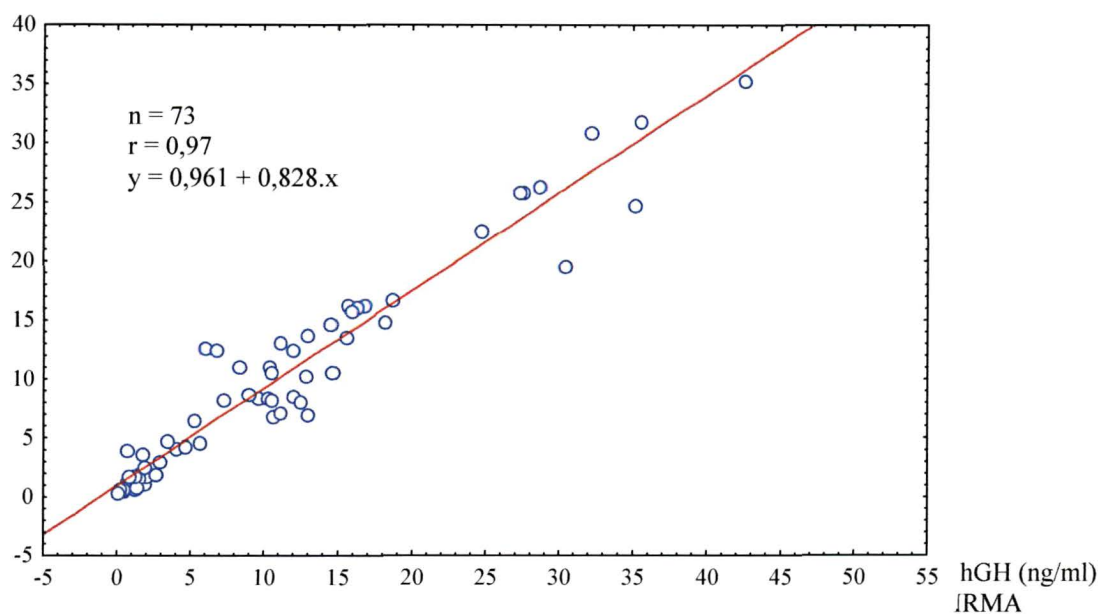


GRÁFICO 7 – CORRELAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS OBTIDOS COM O ELISA SANDUÍCHE E COM O IRMA EM SORO 60' DE MENINAS

hGH (ng/ml) - ELISA

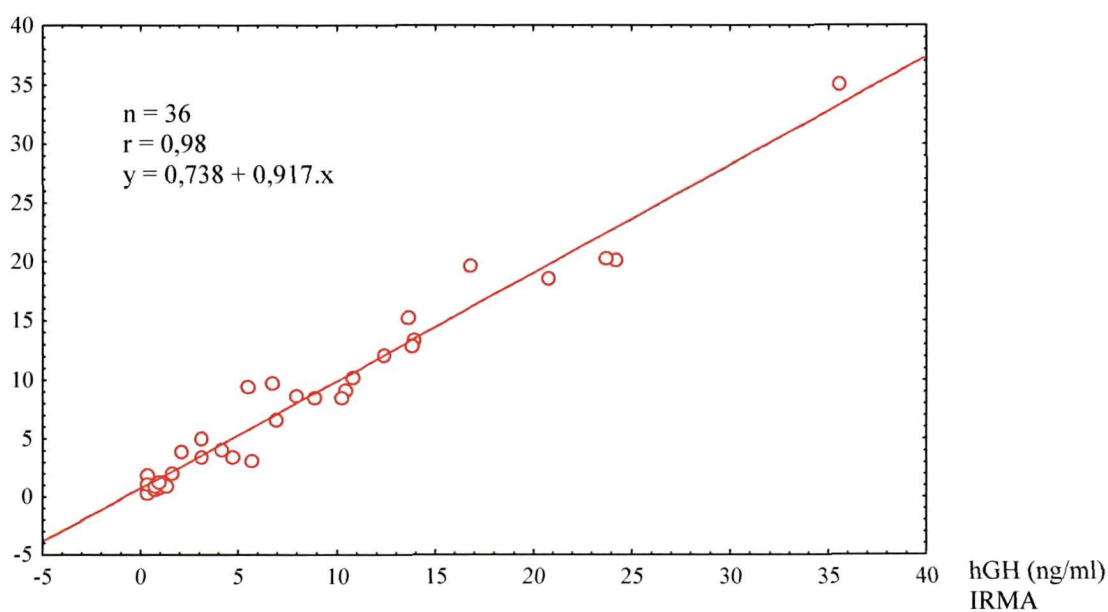


GRÁFICO 8 – CORRELAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS OBTIDOS COM O ELISA SANDUÍCHE E COM O IRMA EM SORO 90' DE MENINOS

hGH (ng/ml) - ELISA

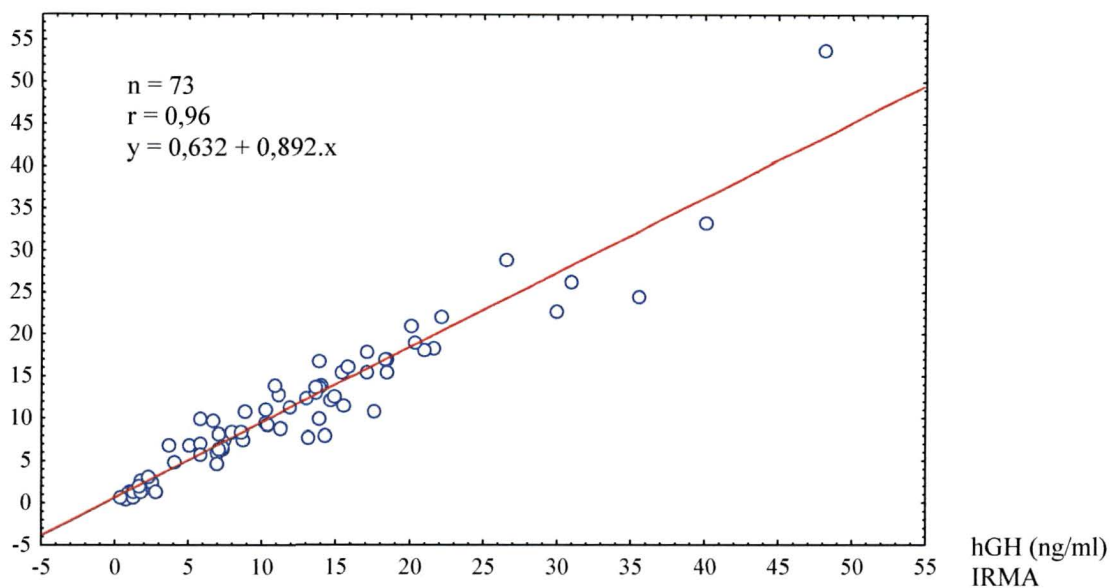


GRÁFICO 9 – CORRELAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS OBTIDOS COM O ELISA SANDUÍCHE E COM O IRMA EM SORO 90' DE MENINAS

hGH (ng/ml) - ELISA

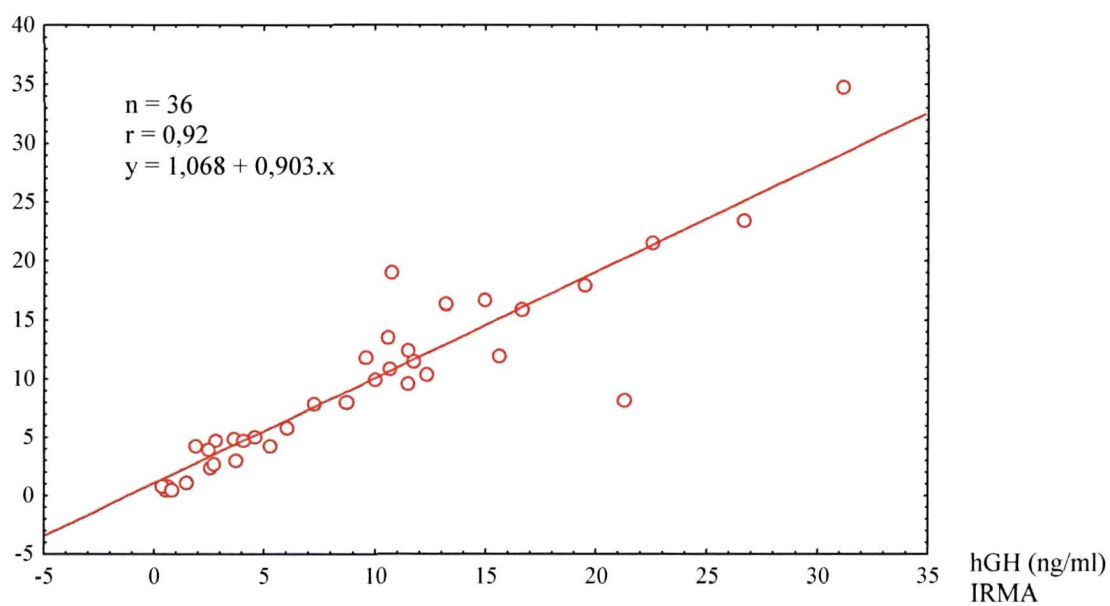


GRÁFICO 10 – CORRELAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS OBTIDOS COM O ELISA SANDUÍCHE E O COM IRMA EM SORO 120' DE MENINOS

hGH (ng/ml) - ELISA

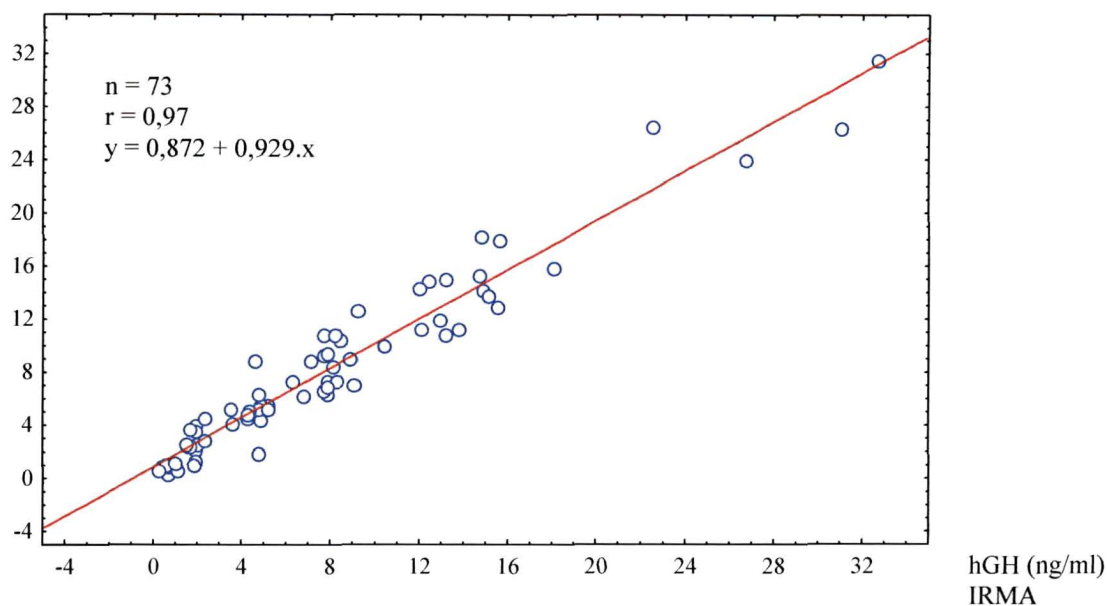
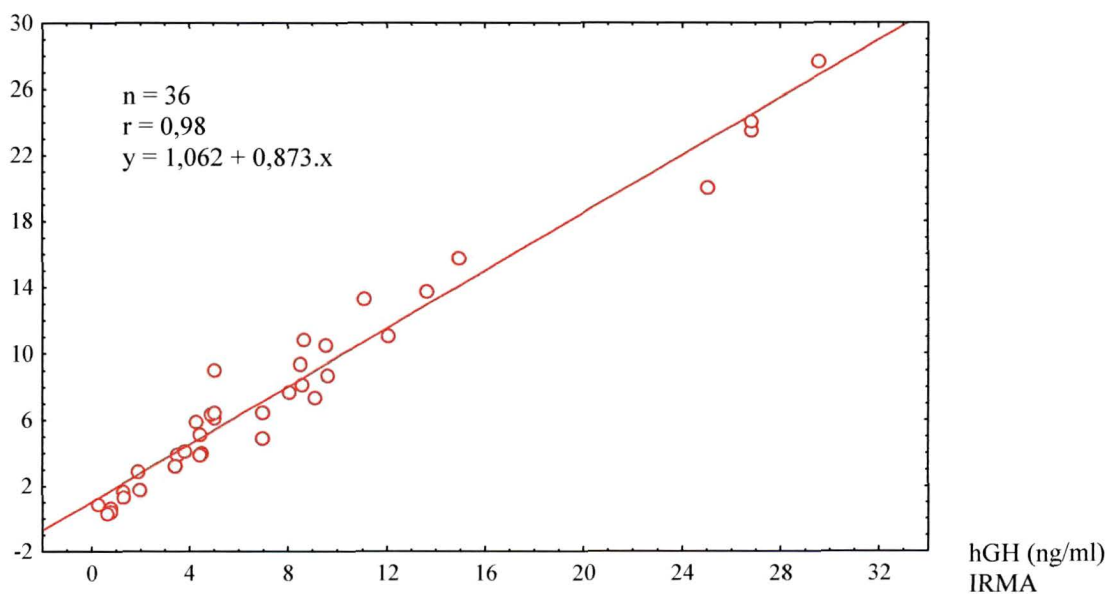


GRÁFICO 11 – CORRELAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS OBTIDOS COM O ELISA SANDUÍCHE E COM O IRMA EM SORO 120' - MENINAS

hGH (ng/ml) - ELISA





### 5.6.1 Avaliação dos resultados discrepantes através do ICMA

Algumas das amostras com resultados discrepantes entre o IRMA e o ELISA sanduíche foram submetidas a um terceiro método considerado de última geração e de aceitação mundial, o ensaio quimioluminométrico (ICMA).

Os resultados obtidos com os três métodos (tabela 5) foram comparados para se verificar a correlação existente entre os ensaios.

**TABELA 5 - COMPARAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS DO ELISA, ICMA E IRMA**

Iniciais	Tempo	ELISA (ng/ml)	ICMA (ng/ml)	IRMA (ng/ml)
AF	Basal	3,95	2,60	2,91
CEFO	60´	19,55	22,20	30,43
CLB	90´	19,07	20,40	10,66
DAS	90´	11,98	13,00	15,53
DP	90´	24,52	31,20	35,46
EAP	90´	10,02	8,20	5,76
GLB	Basal	1,60	1,90	0,45
GLB	120´	9,09	8,10	4,98
IR	90´	9,67	4,70	6,58
JEZ	60´	7,12	7,40	11,10
JEZ	90´	11,52	10,30	15,47
KSS	90´	2,08	1,70	1,55
KSS	120´	8,16	6,50	21,21
LFSP	60´	6,73	10,50	10,53
LOC	60´	6,94	15,00	12,95
LOC	90´	8,11	20,70	14,20
LRM	90´	10,81	8,00	17,47
MP	Basal	3,58	3,10	5,96
PSTF	90´	18,94	18,20	26,45
TCC	Basal	1,30	0,40	0,84
THMF	60´	12,58	14,90	6,00
TS	120´	3,98	4,90	4,34
WS	60´	35,33	35,90	42,54
WS	90´	33,38	34,00	39,96

Como pode ser observado através dos valores de  $r$ , a correlação foi alta entre os três métodos. O coeficiente de correlação entre o ELISA sanduíche e o IRMA foi de 0,90 (gráfico 12), entre o ELISA e o ICMA foi de 0,93 (gráfico 13), enquanto o coeficiente entre o IRMA e o ICMA foi de 0,89 (gráfico 14).

GRÁFICO 12- CORRELAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS OBTIDOS COM O ELISA SANDUÍCHE E COM O IRMA

hGH (ng/ml) - ELISA

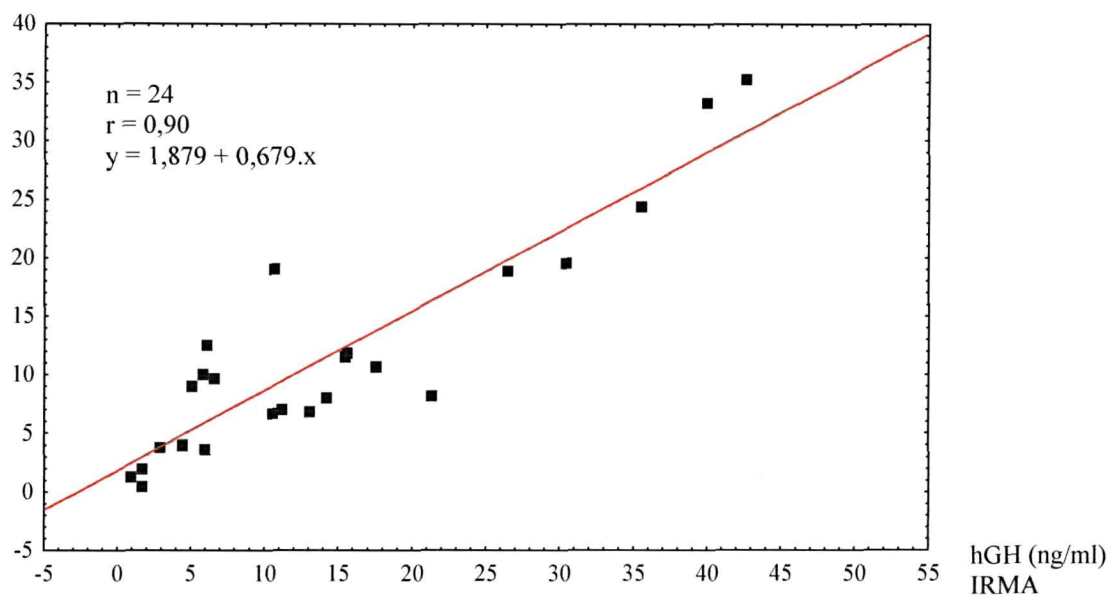


GRÁFICO 13 – CORRELAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS OBTIDOS COM O ELISA SANDUÍCHE E COM O ICMA

hGH (ng/ml) - ELISA

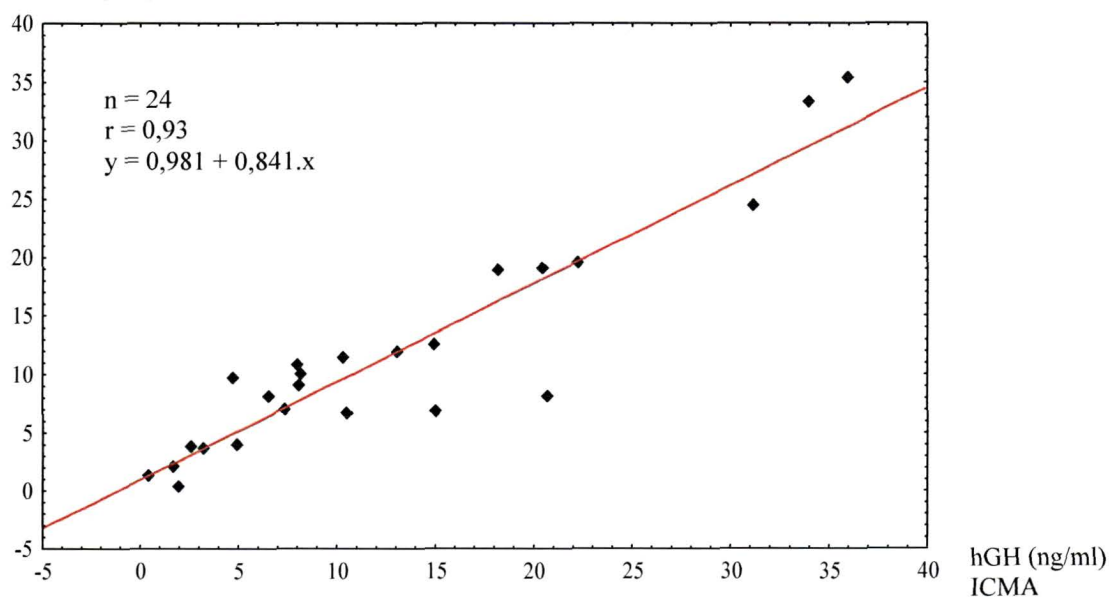
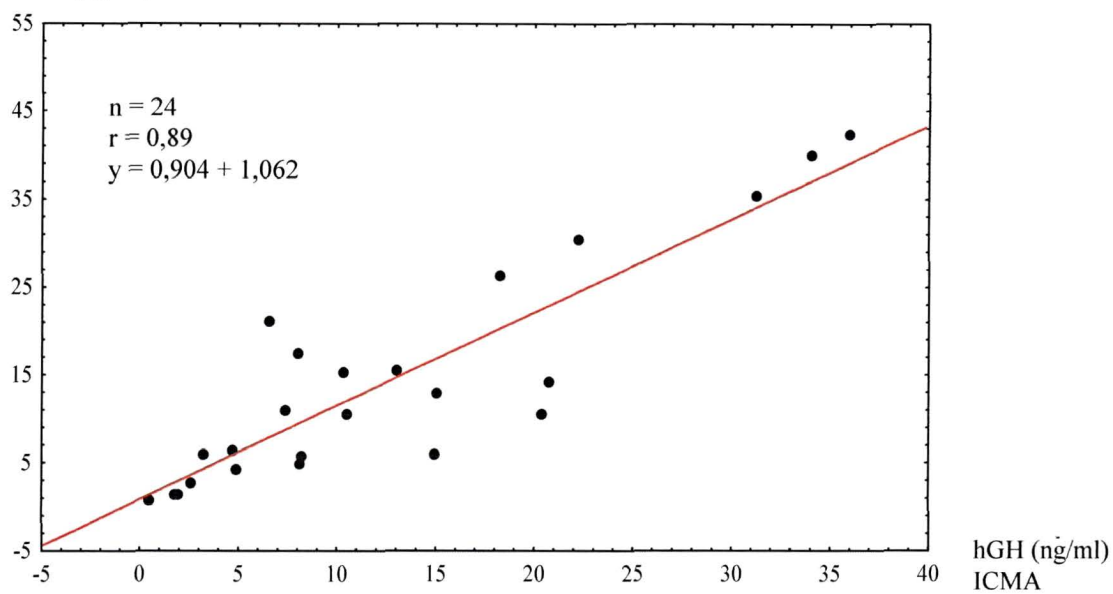


GRÁFICO 14- CORRELAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS OBTIDOS COM O IRMA  
E COM O ICMA

hGH (ng/ml) - IRMA



## 6 DISCUSSÃO

Iniciou-se esta pesquisa com o propósito de desenvolver um método próprio (ELISA sanduíche) de quantificação hormonal com aplicação imediata, empregando-se várias técnicas bioquímicas, cujos protocolos pudessem ser aplicados em experimentos futuros.

Os imunoensaios dependem fundamentalmente da existência de anticorpos específicos para determinados epítomos. Dessa forma, anticorpos policlonais foram produzidos, conjugados à *Horseradish Peroxidase* e purificados, utilizando-se colunas de afinidade (EY *et al.*, 1978; KENT, 1994) ligadas a peptídeos sintéticos (YOUNG *et al.*, 1975) com o objetivo de aumentar sua especificidade.

Após à sétima injeção do antígeno (rhGH, 150 µg/ml/injeção), foram obtidos elevados títulos de anticorpos de cavalo anti-rhGH (1:256.000) pelo ELISA indireto, o suficiente para isolar apenas aqueles que realmente interessavam, ou seja, anticorpos que reconhecessem uma parte do sítio 1 de ligação do hGH (GOFFIN *et al.*, 1996) ao seu receptor (CUNNINGHAM *et al.*, 1991). Isto foi possível utilizando um peptídeo sintético idêntico a uma parte da hélice 4 da carboxila terminal (GOFFIN *et al.*, 1996), correspondente à sequência aa 166-181, que foi ligado covalentemente à *Sepharose*® na montagem da coluna de afinidade empregando métodos de outros estudos (AXEN *et al.*, 1967; YOUNG *et al.*, 1975; EY *et al.*, 1978; AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH, 1993; KENT, 1994).

Após eluição pela coluna de afinidade e concentração em sacos de diálise, a solução contendo imunoglobulinas anti-hélice 4 apresentou uma concentração aceitável de anticorpos (0,948 mg/ml) para o desenvolvimento do imunoensaio desejado (ELISA sanduíche). Entretanto o mesmo sucesso não foi obtido com a concentração do segundo grupo de anticorpos anti *loop* 1, outro segmento do sítio 1 de ligação ao receptor de hGH (CUNNINGHAM *et al.*, 1991; GOFFIN *et al.*, 1996) correspondente à sequência aa 54-71.

O segmento da hélice 4 (aa 166-181), escolhido para ser sintetizado, exclui as cisteínas que formam duas pontes dissulfeto internas entre os aminoácidos 53-165 e

182-189 (WALLIS, 1978) e permite o acesso livre do anticorpo em uma molécula natural de hGH sem a ponte dissulfeto (figura 2). Devido à ausência das cisteínas, há possibilidade do fragmento da hélice 4, fixado por ligação covalente à *Sepharose*<sup>®</sup>, não ter a mesma conformação tridimensional da respectiva sequência na molécula do hGH, porém, se isto aconteceu, não houve alteração suficiente para impedir a purificação dos anticorpos anti-hélice 4. Em contrapartida, a ausência da cisteína 53 e, conseqüentemente, da ponte dissulfeto pode ter alterado a conformação do fragmento do *loop* 1 (aa 54-71) conjugado à *Sepharose*<sup>®</sup> em comparação à molécula natural ou rhGH, e esta modificação pode ter sido a causa da baixa recuperação de anticorpos anti *loop* 1.

A estratégia em se utilizar um fragmento para a purificação de anticorpos (YOUNG *et al.*, 1975; EY *et al.*, 1978; VAN REGENMORTEL *et al.*, 1988) diferente do antígeno empregado na imunização fornece um grupo de imunoglobulinas com características de anticorpos monoclonais, porém com a vantagem de se obter quantidades muito maiores quando se utiliza o soro de um animal ao invés de meios de hibridomas.

Na padronização do ensaio, foi escolhido o anticorpo anti-hélice 4 como primeiro anticorpo, de “captura”, por razões já citadas na revisão de literatura. O segundo anticorpo não deveria interferir ou competir pelo mesmo epítipo de ligação do primeiro anticorpo. Por esta razão, todas as imunoglobulinas anti-rhGH que não reconheceram o segmento correspondente à hélice 4 durante a eluição pela coluna de afinidade, foram recuperadas e conjugadas à *Horseradish Peroxidase* – HP (NAKANE; PIERCE, 1966; NAKANE; KAWOI, 1974).

Optou-se por um ensaio colorimétrico utilizando um substrato da HP pela estabilidade da enzima conjugada a um anticorpo ser de 18 meses, a  $-20^{\circ}$  C (NIELSEN, 1995) e pela disponibilidade da leitora de ELISA. Este marcador tem suas vantagens e desvantagens (quadro 2), porém, para a finalidade a que se destina, tornam-se irrelevantes as desvantagens relacionadas com a menor sensibilidade comparada aos métodos fluoro ou quimioluminescente (FELDKAMP, 1996; KASARARA; NAKAMURA, 1996) em razão da concentração sérica de hGH,

considerado normal, ser elevado nos testes de estímulo, mais precisamente, entre 5 e 10 ng/ml (ANDERSSON *et al.*, 1995; TILLMAN *et al.*, 1997).

A quantidade do primeiro anticorpo (1 µg/poço) foi escolhida a partir da indicação de estudos anteriores (VAN REGENMORTEL, 1988). Definiu-se a concentração do segundo anticorpo (1:1.000) a partir dos resultados obtidos com a padronização, ou seja, optou-se por aquela com melhor padrão de decaimento da coloração (aspecto visual e quantitativo de absorbância) comparando-se várias concentrações utilizadas (área pontilhada da figura 10). Neste mesmo experimento, definiu-se também a escala ideal de uma curva padrão de rhGH, variando de 125 a 0,98 ng/ml, porém valores menores são detectados até 0,12 ng/ml.

Estabelecidos estes três parâmetros, concentrações do primeiro, do segundo anticorpo e curva padrão do rhGH, o passo seguinte foi conhecer as características do ensaio (BISHOP, 2000), ou seja, faixa de linearidade, sensibilidade, precisão, exatidão e especificidade e validar o ensaio através da quantificação do rhGH em amostras conhecidas ou do hGH em soro de pacientes. Por se tratar de um ensaio que utiliza a peroxidase como marcador, foram, arbitrariamente, eliminadas todas as amostras de soro hemolisadas devido à possível interferência da peroxidase endógena.

Verificou-se que a faixa de linearidade, com melhor perfil de trabalho das leituras, está entre os valores de 1,95 e 31,25 ng/ml, porém observa-se também a possibilidade de uma segunda faixa de 0,24 a 1,95 ng/ml, resultando em duas ou mais inclinações diferentes (gráfico 1). A faixa entre 0,12 e 1,95 ng/ml poderia ter uma curva de regressão calculada a partir dos valores das absorbâncias individuais para se determinar a inclinação exata da curva resultante. Todavia, para fins práticos de leitura de qualquer amostra desconhecida, adotaram-se os valores originais plotados em um gráfico e, sem haver prejuízo nas leituras, muitas vezes comparou-se à utilização dos fatores de conversão. Para a finalidade do presente estudo onde as medidas abaixo de 0,98 ng/ml não têm muito valor na quantificação de hGH em soro de crianças, houve maior precisão nos valores acima de 0,98 ng/ml. Considerou-se que, para quantificações de valores mais baixos necessárias para outras finalidades, como em

pesquisas, seria necessário estabelecer outros critérios de padronização, otimizando a faixa de linearidade de 0,12 a 1,95 ng/ml ou a valores ainda menores.

As concentrações de hGH basais de pacientes normais se concentram, geralmente, entre 0,5 e 3 ng/ml, porém, de acordo com a situação clínica do paciente, é importante saber também se há ausência completa de hGH ou se os valores são elevados em resposta ao teste de estímulo ou se há produção autônoma típica dos adenomas. Um teste com resposta considerada mínima dentro da normalidade para crianças está em uma faixa que varia entre 5 e 10 ng/ml (ANDERSSON *et al.*, 1995; TILLMAN *et al.*, 1997).

Para fins práticos, na interpretação dos resultados dos testes de estímulo farmacológico, as variações de hGH a serem consideradas na faixa de segurança são superiores a 0,98 ng/ml. Entretanto a concentração mínima de hGH quantificável (limite mínimo de detecção) foi de 0,12 ng/ml (figura 11), aqui considerada como a sensibilidade mínima avaliada, cujo valor correspondente à menor diferença entre duas médias estatisticamente diferentes, ou seja, os valores das absorbâncias entre “branco”, 0,06 ng/ml e 0,12 ng/ml de rhGH (tabela 1).

Outra característica avaliada em um imunoensaio é a sua reprodutibilidade. Isto foi avaliado através dos coeficientes de variação intra e interensaio que variaram de 4,53 a 6,33% e de 6,0 a 8,27%, respectivamente. A maioria dos coeficientes relatados na literatura situa-se em uma faixa semelhante aos acima citados (PRINGLE *et al.*, 1992; VIEIRA *et al.*, 1992; YUKI; KATO, 1994; REUTENS *et al.*, 1996; LÓPEZ-GUAJARDO *et al.*, 1998; TSUSHIMA *et al.* 1999). A quantificação da soma de duas amostras, uma com rhGH e outra com hGH sérico, empregada para se saber se o percentual recuperado está acima ou abaixo do esperado (100%), é o experimento realizado para se avaliar a exatidão do imunoensaio. Como mostrado na tabela 3, a recuperação variou de 96,02 a 103,82%, o que demonstrou ser uma faixa de variação aceitável para os padrões dos ELISAs comerciais (UNITED BIOTECH, 1999; DIAGNOSTIC SYSTEMS LABORATORIES, 2001; IMMUNO-BIOLOGICAL LABORATORIES, 2001).

A quantificação do hGH de uma amostra (*pool* de soros), após a diluição da concentração inicial, adicionando-se soro de ovelha, cujo GH não foi reconhecido pelo anticorpo de “captura”, foi realizada para avaliação da linearidade do ELISA. Como mostrado na tabela 4, observa-se que, para concentrações de hGH de 3,37 a 11,00 ng/ml, houve uma linearidade mais próxima de 100%, ou seja, houve maior semelhança entre o que foi medido e o que era esperado. Como um teste de estímulo para crianças, para ser considerado responsivo, deve apresentar concentrações de hGH entre 5 e 10 ng/ml, verifica-se, então, que a linearidade obtida para este ELISA satisfaz plenamente o propósito pretendido.

Uma preocupação na caracterização de um determinado anticorpo é saber até que ponto moléculas semelhantes ao antígeno são reconhecidas por esse anticorpo. No caso do hGH de crianças, o hormônio mais parecido com o hGH e que circula em maior concentração é a prolactina. Embora haja somente 20,4% de homologia com o hGH (MILLER; EBERHARDT., 1983; TAKAHASHI *et al.*, 1984; GOFFIN *et al.*, 1996, BLINK, PUBMED, RELATED SEQUENCES, TAXONOMY, 1999b; 2001), o maior número de aminoácidos idênticos se concentram no sítio 1 de ligação do hGH ao seu receptor que inclui as seqüências aa 8-28, aa 58-66, aa 81-88 e aa 164-183 (RIVERO *et al.*, 1990; GOFFIN *et al.*, 1996).

A especificidade do anticorpo, ou mais provavelmente do grupo de anticorpos, anti-hélice 4 foi testada utilizando-se duas fontes comerciais de prolactina. Conforme mostrado na figura 12, nota-se que, mesmo com uma concentração de 500 ng/ml de prolactina, a absorbância obtida foi semelhante a do branco. Portanto estes resultados indicaram ausência de reação cruzada e afastaram a hipótese de haver falsa quantificação de hGH por conta do reconhecimento da prolactina circulante, tendo em vista que, em crianças, valores elevados de prolactina são freqüentes devido ao estresse durante os testes de estímulo do hGH.

Depois de padronizar e identificar as principais características do ELISA sanduíche, foram quantificadas 436 amostras de 109 crianças (4 amostras/criança) submetidas aos testes de estímulo com clonidina com a finalidade de identificar aquelas com pico de resposta acima de 7 ng/ml, um valor de corte, escolhido



arbitrariamente, baseado na média aproximada dos valores citados na literatura (ANDERSSON *et al.*, 1995; TILLMANN *et al.*, 1997). Os resultados médios obtidos de duplicatas com o ELISA foram comparados com os valores individuais do IRMA (monoplicatas) e, como o previsto, algumas amostras apresentaram determinações diferentes entre estes dois ensaios. Verificou-se que houve maiores discrepâncias com valores abaixo de 2 e acima de 20 ng/ml, porém, como os resultados obtidos com o IRMA para hGH realizado no Hospital de Clínicas são calculados a partir de uma única dosagem (para redução dos custos), é possível haver erros na quantificação da radioatividade, sem excluir também a possibilidade de erros com o ELISA.

Para se avaliar as discrepâncias entre estes dois ensaios, 24 amostras séricas com determinações diferentes foram encaminhadas a um laboratório comercial que utiliza o método quimioluminométrico (ICMA). Porém, como pode ser observado na tabela 5, os dados obtidos com o ICMA não esclareceram possíveis erros entre os métodos IRMA e ELISA, pois como mostrado nos gráficos de 4 a 11, os coeficientes de correlação entre os três ensaios são altos.

Concordando com os estudos de PRINGLE *et al.*, 1992, houve boa correlação ( $r = 0,90$ ) entre o ELISA e o IRMA. A correlação entre o ELISA e o ICMA foi de 0,93, enquanto o coeficiente entre o ICMA e o IRMA foi de 0,89. Por estes valores de  $r$ , não se definiu qualquer tendência de erro no IRMA, ELISA ou ICMA. Esta conclusão não foi surpreendente, pois, conforme mostrado por L'HERMITE-BALÉRIAUX *et al.* (1996), as discrepâncias entre estes métodos são comuns. Estas diferenças são atribuídas ao calibrador utilizado (CELNIKER *et al.*, 1989; STRASBURGER *et al.*, 1996), aos parâmetros de padronização (FELDER *et al.*, 1989), à interferência da GHBP (BAUMANN, 1990; GRANADA *et al.*, 1990; JANSSON *et al.*, 1997; EBDROP *et al.*, 1999) e, principalmente, à multiplicidade das formas moleculares do hGH e à especificidade dos anticorpos aos diversos epítomos (CELNIKER *et al.*, 1989; STRASBURGER, 1990; BAUMANN, 1991; STRASBURGER, 1994; MELLADO *et al.*, 1996; RAKOVER *et al.*, 2000). GRANADA *et al.* (1990) ao compararem 11 tipos de imunoensaios para hGH, encontraram diferenças entre eles de até 250%, sendo que as maiores divergências

ocorreram com ensaios, cujos anticorpos são monoclonais (LEVIN *et al.*, 1987). CELNIKER *et al.* (1989) observaram que, entre dois IRMAs comerciais, empregando anticorpos monoclonais, somente um deles identificou a isoforma 20 kDa. Estes dados evidenciam, portanto, que a disponibilidade de um grande número de anticorpos monoclonais anti-hGH (STRASBURGER, 1989b) faz com que muitos epítomos diferentes sejam reconhecidos, o que pode vir a interferir nos resultados entre os imunoenaios (STRASBURGER, 1990, 1994).

Quanto à heterogeneidade de formas moleculares do hGH (BAUMANN, 1991; BAUMANN *et al.*, 1994; LEWIS *et al.*, 1994; JANSSON *et al.*, 1997), aproximadamente um terço destas moléculas são encontradas na forma de dímeros, oligômeros e de fragmentos proteoliticamente degradados que possuem pouca (BAUMANN, 1991) ou nenhuma função biológica (STRASBURGER, 1994), mas que exibem imunorreatividade de 20 a 100% dependendo do ensaio e do anticorpo utilizado (BROSTEDT *et al.*, 1990).

Dessa forma, ao se aplicar um anticorpo anti-sítio 1 do hGH a uma fase sólida de um ELISA sanduíche, não se avaliou somente a imunorreatividade do hGH detectada nos ensaios convencionais, mas também a capacidade da molécula em produzir um efeito biológico através do sítio 1 de ligação ao receptor somatogênico, característica antes evidenciada somente em ensaios onerosos ou impraticáveis na rotina laboratorial como os imunofuncionais (STRASBURGER *et al.*, 1996) e os bioensaios (TANAKA *et al.*, 1980).

O anticorpo de captura produzido e empregado no ELISA reconhece uma parte do sítio 1 do hGH, que por cristalografia (DE VOS *et al.*, 1992), provou-se ser, assim como o sítio 2, uma região de ligação da GHBP, com a mesma especificidade e afinidade existentes entre o hGH e seu receptor (SPENCER *et al.*, 1988). No plasma, quando há excesso de hGH, o complexo hGH.(GHBP)<sub>2</sub> dissocia-se, por isso há sempre um equilíbrio entre o complexo e a fração livre de hGH.

O papel do GHBP ainda é incerto, porém há estudos que sugerem o efeito regulatório positivo sobre a ação do hGH, aumentando a sua meia vida na circulação (BAUMANN *et al.*, 1986) ou como um inibidor, competindo com os receptores

teciduais (MANNOR *et al.*, 1991). Portanto é importante avaliar qualquer interferência da GHBP nos resultados do ELISA com amostras séricas e saber até que ponto a GHBP poderia deslocar ou até mesmo impedir a ligação do primeiro anticorpo, anti-hélice 4, ao hGH sérico. Para este fim, seria preciso empregar GHBP recombinante em concentrações crescentes juntamente com o rhGH e analisar os resultados do ELISA. Ambos os complexos, anticorpo-rhGH e GHBP-rhGH, poderiam também ser submetidos à cristalografia de raios X no sentido de se verificar se há pontos de ligação em comum e, ainda, se seria possível um complexo ternário GHBP-rhGH-anticorpo com ou sem o sítio 2 livre. Todas estas possibilidades exigem estudos mais longos, que serão oportunamente realizados.

As concentrações séricas da GHBP total são estáveis ao longo do dia, entretanto a formação do complexo hGH.(GHBP)<sub>2</sub> varia em função de picos de secreção do hGH (BAUMANN *et al.*, 1988a). Embora a concentração de GHBP varie consideravelmente de paciente para paciente, ao se comparar as concentrações basais consideradas normais, verificam-se concentrações de 65 a 394 pmol/l para GHBP (MASSA *et al.*, 1992; MARTHA *et al.*, 1993; ELIAKIM *et al.*, 1996) e de 22,73 a 136,36 nmo/l para o hGH (0,5 a 3 ng/ml).

Segundo BAUMANN *et al.* (1988a, 1988b), a GHBP de alta afinidade se liga a cerca de 28–45% do hGH em condições basais, o que sugere a possibilidade de interferência nas medidas de hGH pelo ELISA sanduíche como foi verificado por STRASBURGER *et al.* (1996) em seu ensaio imunofuncional e nos ensaios analisados por JAN *et al.* (1991). Foi sugerido que a afinidade dos anticorpos utilizados nos ensaios seria maior do que a afinidade da GHBP pelo hGH (BAUMANN, 1990). Se fosse este o caso, qualquer molécula de hGH complexada com a GHBP tenderia a se dissociar e combinar com o anticorpo durante a incubação, havendo apenas um pequeno efeito inibidor da GHBP sobre o complexo antígeno-anticorpo (JAN *et al.*, 1991).

Como este ELISA apresenta menor exatidão entre as concentrações de 0,12 a 1,95 ng/ml, não se pode descartar a possibilidade de que haja interferência da GHBP neste intervalo. Por este ângulo de raciocínio seria esperada uma subestimação dos

valores basais das crianças em relação ao IRMA ou ao ICMA, como foi observado por GRANADA *et al.* (1990) e por JANSSEN *et al.* (1997). Entretanto aconteceram ambas as situações, ou seja, amostras com determinações do ELISA superiores ao IRMA e vice-versa.

A inexatidão para valores inferiores a 1,95 ng/ml pode estar relacionada a outros fatores, pois, na realidade, o anticorpo de “captura” está representado por um grupo de imunoglobulinas que, provavelmente, reconhecem várias combinações de aminoácidos dentro das muitas possibilidades existentes nos 16 aminoácidos correspondentes à parte da hélice 4. Enquanto há um limite de ligações para o primeiro anticorpo (1 µg) em cada poço, ocorre a amplificação do sinal com o segundo anticorpo conjugado à HP que, ainda, pode se ligar a todos os outros epítomos do hGH. À interpretação destas situações, poderia ser acrescentada outra especulação, ou seja, para o primeiro anticorpo existiria um limiar de saturação mais fácil de ser atingido do que para o segundo anticorpo.

A vantagem em se desenvolver um ELISA sanduíche com um segundo anticorpo, amplificando o sinal, oferece a possibilidade de se poder determinar concentrações de hGH mais baixas desde que toda a padronização seja feita para este fim, não, porém, para exames de rotina da prática clínica como foi o propósito deste estudo.

Outra hipótese a ser testada em outros estudos é a possibilidade de haver formas biologicamente diferentes em parte das crianças analisadas, sobretudo, nas amostras, cujas quantificações foram divergentes entre o ELISA e os outros dois ensaios. Neste sentido, seria mais objetivo analisar as amostras cujas concentrações foram mais baixas no ELISA sanduíche.

## 7 CONCLUSÕES

As principais conclusões obtidas nesta pesquisa responderam plenamente aos objetivos pretendidos.

1. Um grupo de anticorpos policlonais que reconhecem uma parte específica da molécula do hGH com características de anticorpos monoclonais e com elevada especificidade a ponto de não haver reação cruzada com hPRL que apresenta 20,4% de homologia, pode ser empregado como anticorpo de “captura” na preparação de um ELISA sanduíche;
2. O segundo grupo de anticorpos policlonais selecionados, que não reconhece o mesmo epítipo que o anticorpo de “captura”, foi satisfatoriamente conjugado com HP e atendeu às necessidades de um bom desempenho na ampliação do sinal no ELISA sanduíche desenvolvido;
3. As características encontradas para este ELISA sanduíche garantem sua utilização na quantificação de hGH na rotina laboratorial, porém, para fins de pesquisa, seriam necessários estudos adicionais;
4. Apesar de haver grande correlação entre os resultados do IRMA e do ELISA, encontraram-se discrepâncias que não foram elucidadas com as quantificações obtidas com um terceiro método (ICMA).

## REFERÊNCIAS

ALBERTSSON-WIKLAND, K.; JANSSON, C.; ROSBERG, S.; NOVAMO, A. Time-resolved immunofluorometric assay of human growth hormone. **Clin Chem**, v. 39, n. 8, p. 1620-1625, 1993.

AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH, **Affinity chromatography**. Principles and methods. Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, 1993.

AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH. **Protein Purification**. Piscataway: Pharmacia & Upjohn, 1998.

ANDERSEN, M.; PETERSEN, P.H.; BLAABJERG, O.; HANGAARD, J.; HAGEN, C. Evaluation of growth hormone assays using ratio plots. **Clin Chem**, v. 44, n. 5, p.1032-1038, 1998.

ANDERSSON, A-M.; ORSKOV, H.; RANKE, M.B.; SHALET, S.; SKAKKEBAEK, N.E. Interpretation of growth hormone provocative tests: comparison of cut-off values in four European laboratories. **Eur J Endocrinol**, v. 132, p. 340-343, 1995.

ARGETSINGER, L.S.; HSU, G.W.; MYERS Jr, M.G.; BILLESTRUP, N.; WHITE, M.F.; CARTER-SU, C. Growth hormone, interferon gamma and leukemia inhibitory factor promoted tyrosyl phosphorylation of insulin receptor substrate-1. **J Biol Chem**, v. 270, n. 24, p. 14685-14692, 1995.

ARGETSINGER, L.S.; NORSTEDT, G.; BILLESTRUP, N.; WHITE, M.F.; CARTER-SU, C. Growth hormone, interferon-gamma and leukemia inhibitory factor utilize insulin receptor substrate-2 in intracellular signaling. **J Biol Chem**, v. 271, n. 46, p. 29415-29421, 1996.

AXEN, R.; PORATH, J.; ERNBACK, S. Chemical coupling of peptides and proteins to polysaccharides by means of cyanogen halides, **Nature**, v. 214, p. 1302-1311, 1967.

BANFI, G.; MARINELLI, M.; CASARI, E.; MURONE, M.; BONINI, P. Isotopic and nonisotopic assays for measuring somatotropin compared: re-evaluation of cutoff value in provocative tests. **Clin Chem**, v. 37, n. 2, p. 273-276, 1991.

BANGHAM, D.R.; DAS, R.E.G.; SCHULSTER, D. The international standard for human growth hormone for bioassay: calibration and characterization by international collaborative study. **Mol Cell Endocrinol**, v. 42, p. 269-282, 1985.

BAUMANN, G.; STOLAR, M.W; AMBURN, K. Molecular forms of circulating growth hormone during spontaneous secretory episodes and in the basal state. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 60, p. 1216-1220, 1985.

BAUMANN, G.; STOLAR, M.W; AMBURN, K; BARSANO, C.P; DE VRIES, B.C. A specific growth hormone-binding protein in human plasma: initial characterization. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 62, n. 1, p. 134-141, 1986.

BAUMANN, G. and STOLAR, M.W. Molecular forms of human growth hormone secreted in vivo: nonspecific of secretory stimuli. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 62, n. 4, p. 789-790, 1986.

BAUMANN, G.; AMBURN, K.; SHAW, M.A. The circulating growth hormone (GH)-binding proteins complex: a major constituent of plasma in GH in man. **Endocrinol**, v. 122, p. 976-984, 1988(a).

BAUMANN, G.; SHAW, M.A.; AMBURN, K. A rapid and simple assay for growth hormone-binding proteins activity in human plasma. **Acta Endocrinologica (Copenh)**, v. 119, p.529-534, 1988(b).

BAUMANN, G. Growth hormone binding proteins and various forms of growth hormone: implications for measurements. **Acta Paediatr Scand [Suppl]**, v. 370, p. 72-80, 1990.

BAUMANN, G. Growth hormone heterogeneity: genes, isohormones, variants, and binding proteins. **Endocr Rev**, v.12, n. 4, p. 424- 449, 1991.

BAUMANN, G.; SHAW, M.; AMBURN, K.; JAN, T.; DAVILA, N.; MERCADO, M.; STOLAR, M.; MACCART, J. Heterogeneity of circulating growth hormone. **Nucl Med Biol**, v. 21, n. 3, p. 369-379, 1994.

BIODATA DIAGNOSTICS. **hGH MAIACLONE**. Jul, 1998. Product manual.

BISHOP, M.L. Clinical chemistry, principles, procedures, correlations, 4.<sup>th</sup> ed Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins, 2000.

BLINK, PUBMED, RELATED SEQUENCES, TAXONOMY. **Protein.** Horse somatotropin precursor. Disponível em <http://www.ncbi.nih.gov/entrez/viewer.cgi>> Acesso em 24 fev 1999(a).

BLINK, PUBMED, RELATED SEQUENCES, TAXONOMY. **Protein.** Human somatotropin precursor. Disponível em <http://www.ncbi.nih.gov/entrez/viewer.cgi>> Acesso em 24 fev 1999(b).

BLINK, PUBMED, RELATED SEQUENCES, TAXONOMY. **Protein.** Human prolactin. Disponível em <http://www.ncbi.nih.gov/entrez/viewer.cgi>> Acesso em 9 fev 2001.

BOLE-FEYSOT C, GOFFIN V, EDERY M, BINART N, KELLY PA. Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. **Endocr Rev**, v. 19, n. 3, p. 225-268, 1998.

BOUILLON, R. Growth hormone and bone. **Horm Res**, v. 36, Supl. 1, p. 49-55, 1991.

BRIGHT, G.M.; ROGOL, A.D.; JOHANSON, A.J.; BLIZZARD, R.M. Short stature associated with normal growth hormone and decreased somatomedin-C concentrations: response to exogenous growth hormone. **Pediatrics**, v. 71, p. 576-580, 1983.

BROSTEDT, P.; LUTHMAN, M.; WIDE, L.; WERNER, S.; ROOS, P. Characterization of dimeric forms of human pituitary growth hormone by bioassay, radioreceptor assay and radioimmunoassay. **Acta Endocrinol (Copenh)**, v. 122, p. 241-248, 1990.

BUTLER, J.E. Solids supports in enzyme-linked immunosorbent assay and other solid-phase immunoassays. **Methods**, v. 22, p. 4-23, 2000.

CARTER-SU, C.; RUI, L. Role of tyrosine kinase JAK2 in signal transduction by growth hormone. **Pediatr Nephrol**, v. 14, p. 550-557, 2000.

CELNIKER, A. C.; CHEN, A.B.; WERT, R.M.; SHERMAN, B.M. Variability in the quantitation of circulating growth hormone using commercial immunoassays. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 68, n. 2, p. 469-476, 1989.



CHATELAIN, P.; BOUILLAT, B.; COHEN, R.; SASSOLAS, G.; SOUBERBIELLE, J.C.; RUITTON, A.; JOLY, M. O.; JOB, J.C. Assay of growth hormone levels in human plasma using commercial kits: analysis of some factors influencing the results. **Acta Paediatr Scand [Suppl]**, v. 370, p.56-61, 1990.

CHEN, E.Y.; LIAO, Y.C.; SMITH, D.H.; BARRERA-SALDAÑA, H. A.; GELINAS, R. E.; SEEBURG, P. H. The human growth hormone locus: nucleotide sequence, biology and evolution. **Genomics**, v. 4, p. 479-497, 1989.

CHEN, C.; BRINKWORTH, R.; WATERS, M.J. The role of receptor dimerization domain in growth hormone signaling. **J Biol Chem**, v. 272, n. 8, p. 5133-5140, 1997.

CUATRECASAS, P. Agarose derivatives for purification of protein by affinity chromatography. **Nature**, v. 228, p. 1327-1332, 1970.

CUNNINGHAM, B.C; ULTSCH, M.; DE VOS, A.M.; MULKERRIN, M.G.; CLAUSER, K.R.; WELLS, J.A. Dimerization of the extracellular domain of the human growth hormone receptor by a single hormone molecule. **Science**, v. 254, p. 821-825, 1991.

CUNNINGHAM, B.C.; WELLS, J.A. Rational design of receptor-specific variants of human growth hormone. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 88, p. 3407-3411, 1991.

DATTANI, M.T.; HINDMARSH, P.C.; PRINGLE, P.J.; BROOK, C.G.; MARSHALL, N.J. The measurement of growth hormone bioactivity in patient serum using an eluted stain assay. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 80, p. 2675-2683, 1995.

DAUGHADAY, W.H. Growth hormone axis overview – somatomedin hypothesis. **Pediatr Nephrol**, v.14, p. 537-540, 2000.

DE NOTO, F.M.; MOORE, D.D.; GOODMAN, H.M. Human growth hormone DNA sequence and mRNA structure: possible alternative splicing. **Nucleic Acids Res**, v. 9, n. 15, p. 3719-3730, 1981.

DE VOS, A.M.; ULTSCH, M.; KOSSIAKOFF, A.A. Human growth hormone and extracellular domain of its receptor: crystal structure of the complex. **Science**, v. 255, p. 306-312, 1992.

DIAGNOSTIC PRODUCTS CORPORATION. **Immulite 2000** – Growth Hormone (hGH). Set, 2001. Product manual.

DIAGNOSTIC SYSTEMS LABORATORIES. **Active ultra-sensitive human growth hormone** – ELISA. Disponível em <<http://www.dslabs.com>> Acesso em 15 jul. 2001.

EBDRUP, L.; FISKE, S.; SORESEN, H.H.; RANKE, M.B.; ORSKOV, H. Variety in growth hormone determinations due to use of different immunoassays and to the interference of growth hormone-binding protein. **Horm Res**, v. 51, Supl 1, p. 20-26, 1999.

ELIAKIM, A.; BRASEL, J.A.; MOHAN, S.; BARSTOW, T.J.; BERMAN, N.; COOPER, D.M. Physical fitness, endurance training and the GH insulin-like growth factor I system in adolescent females. **J Clin Endocr Metab**, v. 81, n. 11, p. 3986-3992, 1996.

ENGVAL, E.; PERLMAN, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. **Immunochem**, v. 8, p. 871-874, 1971.

EY, P.L.; PROUSE, S.J.; JENKIN, C.R. Isolation of pure IgG1a, IgG2a and IgG2b immunoglobulins from mouse serum using protein A-Sepharose. **Immunochem**, v.15, p. 429-436, 1978.

FELDER, R.A.; HOLL, R.W.; MARTHA Jr, P. Influence of matrix on concentrations of somatotropin measured in serum with commercial immunoradiometric assays. **Clin Chem**, v. 35, p. 1423-1426, 1989.

FELDKAMP, C.S. Immunochemical techniques. In: KAPLAN, L.A.; PESCE, A.J. **Clinical Chemistry, theory, analysis and correlation**, 3<sup>a</sup> ed, Ed. Mosby, p. 225 – 249, 1996.

FRANKENNE, F.; SCIPPO, M-L.; Van BEEUMEN, J.; IGOUT, A.; HENNEN, G. Identification of placental human growth hormone as the growth hormone-V gene expression product. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 71, p. 15-18, 1990.

FRIGERI, L.G.; TEGUH, C.; LING, N.; WOLFF, G.L.; LEWIS, U.J. Increased sensitivity of adipose tissue to insulin after *in vivo* treatment of yellow A<sup>vy</sup>/A obese mice with amino-terminal peptides of human growth hormone. **Endocrinol**, v. 122, p. 2940-2945, 1988.

GEORGE, D.L.; PHILLIPS, J.A.; FRANCKE, U.; SEEBURG, P.H. The genes for growth hormone and chorionic somatomotropin are on the long arm of human chromossome 17 in region q21 to qter. **Hum Genet**, v. 57, p. 138-141, 1981.

GOFFIN, V.; SHIVERICK, K.T.; KELLY, P.A.; MARTIAL, J.A. Sequence-funcional relationships within the expanding family of prolactin, growth hormone, placental lactogen and related proteins in mammals. **Endocr Rev**, v. 17, n. 4, p. 385-404, 1996.

GOFFIN, V.; KELLY, P. A. The prolactin/growth hormone receptor family: structure/function relationships. **J Mammary Gland Biol Neoplasia**, v. 2, n. 1, p. 7-17, 1997.

GRANADA, M.L.; SANMARTIN, A.; LUCAS, A.; SALINAS, I.; CARRASCOSA, A.; FOZ, M.; AUDI, L. Assay-dependent results of immunoassayable spontaneous 24-hour growth hormone secretion in short children. **Acta Paediatr Scand [Suppl]**, v. 370, p. 63-70, 1990.

HAN, Y.; LEAMAN, D.W.; WATLING, D.; ROGERS, N.C.; GRONER, B.; KERR, I.M.; WOOD, W.I.; STARK, G.R. Participation of JAK and STAT proteins in growth hormone-induced signaling. **J Biol Chem**, v. 271, n. 10, p. 5947-5952, 1996.

HANDWERGER, S.; FREEMARK, M. The roles of placental growth hormone and placental lactogen in the regulation of human fetal growth hormone and development. **J Pediatr Endocrinol Metab**, v. 13, p. 343-356, 2000.

HASHIMOTO, Y.; IKEDA, I.; IKEDA, M.; TAKAHASHI, Y.; HOSAKA, M.; UCHIDA, H.; HONO, N.; FUKUI, H.; MAKINO, T.; HONJO, M. Construction of a specific and sensitive sandwich enzyme immunoassay for 20 kDa human growth hormone. **J Immunol Methods**, v. 221, p. 77-85, 1998.

HAYEK, A.; PEAKE, G.H. A new syndrome of short stature due to biologically inactive but immunoreactive growth hormone. **Pediatr Res**, v. 12, p. 413-416, 1978.

HERMAN-BONERT, V.S.; PRAGER, D.; MELMED S. Growth Hormone. In: SHLOMO MELMED (Ed.). **The Pituitary**. New York: Blackwell Science, p. 98-135, 1995.

IMMUNO-BIOLOGICAL LABORATORIES. **hGH ELISA**. Disponível em <<http://www.ibl.hamburg.com>> Acesso em 21 ago. 2001.

IRANMANESH, A.; GRISSE, B, VELDHUIS, J.D. Low basal and persistent pulsatile growth hormone secretion are revealed in normal and hyposomatotropic men studied with a new ultrasensitive chemiluminescence assay. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 78, p. 526-535, 1994.

ISHIKAWA, M.; YOKOYA, S., TACHIBANA, K.; HASEGAWA, Y.; YASUDA, T.; TOKUHIRO, E.; HASHIMOTO, Y.; TANAKA, T. Serum levels of 20-Kilodalton human growth hormone (GH) are parallel those of 22-Kilodalton human GH in normal and short children. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 84, n. 1, p. 98-104, 1999.

ISHIKAWA, M.; TACHIBANA, T.; KAMIOKA, T.; HORIKAWA, R.; KARSUMATA, N.; TANAKA, T. Comparison of the somatogenic action of 20 kDa- and 22 kDa-human growth hormones in spontaneous dwarf rats. **Growth Horm IGF Res**, v. 10, n. 4, p. 199-206, 2000.

JAN, T.; SHAW, M. A.; BAUMANN, G. Effects of growth hormone-binding proteins on serum growth hormone measurements. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 72, n. 2, p. 387-391, 1991.

JANSSON, C.; BOGUSZEWSKI, C.; ROSBERG, S.; CARLSSON, L.; ALBERTSSON-WIKLAND, K. Growth hormone (GH) assay: influence of standard preparations, GH isoforms, assay characteristics, and GH-binding protein. **Clin Chem**, v. 43, n. 6, p. 950-956, 1997.

KASAHARA, Y.; NAKAMURA, R.M. Immunoassays and Immunochemistry. In: HENRY, J.B. **Clinical diagnosis and management by laboratory methods**, 9 ed. Ed. W.B. Saunders Company, p. 851-876, 1996.

KENT, U.M. Purification of antibodies using affinity chromatography. **Methods Mol Biol**, v. 34, p. 29-35, 1994.

KINET, S.; BERNICHTEIN, S.; KELLY, P.A.; MARTIAL, J.A.; GOFFIN, V. Biological properties of human prolactin analogs depend not only on global hormone affinity, but also on the relative affinities of both receptor binding sites. **J Biol Chem**, v. 274, n. 37, p. 26033-26043, 1999.

KOHN, J.; WILCHEK, M. Mechanism of activation of Sepharose and Sephadex by cyanogen bromide. **Enzyme Microb Technol**, v. 13, p. 921-927, 1982.

KOWARSKI, A.A.; SCHNEIDER, E.; BEN-GALIM, E.; WELDON, V.V.; DAUGHADAY, W.H. Growth failure with normal serum RIA-GH and low somatomedin activity: somatomedin restoration and growth acceleration after exogenous GH. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 47, p. 461-464, 1978.

L'HERMITE-BALÉRIAUX, M.; COPINSCHI, G.; VAN CAUTER, E. Growth hormone assays: early to latest test generations compared. **Clin Chem**, v. 42, n. 11, p. 1789-1795, 1996.

LE ROITH, D.; SCAVO, L.; BUTLER, A. What is the role of circulating IGF-I? **Trends Endocrinol Metab**, v. 12, v. 2, p. 48-52, 2001.

LEUNG, D.W.; SPENCER, S.A.; CACHIANES, G.; HAMMONDS, R.G.; COLLINS, C.; HENZEL, W.J.; BARNARD, R.; WATERS, M.J.; WOOD, W.I. Growth hormone receptor and serum binding protein: purification, cloning and expression. **Nature**, v. 330, p. 537-543, 1987.

LEVIN, P.A.; CHALEW, S.A., MARTIN, L., KOWARSKI, A. A. Comparison of assays for growth hormone using monoclonal or polyclonal antibodies for diagnosis of growth disorders. **J Lab Clin Med**, v. 109, n. 1, p. 85-88, 1987.

LEWIS, U.J.; DUNN, J.T.; BONEFELD, L.F.; SEAVEY, B.K.; VANDERLAAN, W. P. A naturally occurring structural variant of human growth hormone. **J Biol Chem**, v. 253, p. 2679-2687, 1978.

LEWIS, U.J. Growth Hormone - What is it and what does it do? **Trends Endocrinol Metab**, v. 3, n. 2, p. 117-121, 1992.

LEWIS, U.J.; SINHA, Y.N.; HARO, L.S. Variant forms and fragments of human growth hormone in serum. **Acta Paediatr [Suppl]**, v. 399, p. 29-31, 1994.

LIEBHABER, S.A.; URBANEK, M.; RAY, J.; TUAN, R.S.; COOKE, N. E. Characterization and histologic localization of human growth hormone-variant gene expression in the placenta. **J Clin Invest**, v. 83, p. 1985-1991, 1989.

LÓPEZ-GUAJARDO, C.C. ; ARMSTRONG, L.S.; JORDAN, L. STATEN, N. R.; KRIVI, G.G.; MARTINEZ, A.O.; HARO, L.S. Generation, characterization and utilization of anti-human growth hormone 1-43, (hGH<sub>1-43</sub>), monoclonal antibodies in an ELISA. **J Immunol Methods**, v. 215, p. 179-185, 1998.

MANNOR, D.A.; WINER, L.M.; SHAW, M.A.; BAUMANN, G. Plasma growth hormone binding proteins: effects on growth hormone binding to receptors and on growth hormone action. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 73, p. 30-34, 1991.

MARTHA, P.M.Jr.; ROZOL, A.P.; CARLSSON, L.M.; GESUNDHEIT, N.; BLIZZARD, R.M. A longitudinal assessment of hormonal and physical alterations during normal puberty in boys. Serum growth hormone-binding protein. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 77, n. 2, p. 452-457, 1993.

MASSA, G., DE ZEHER, F.; VANDERSCHUEREN-LODEWEYCKX, M. Serum growth hormone-binding proteins in the human fetus and infant. **Pediatr Res**, v. 32, p. 69-72, 1992.

MAURAS, N.; WALTON, P.; NICAR, M.; WELCH, S.; ROGOL, A.D. Growth hormone stimulation testing in both short and normal statured children: use of an immunofunctional assay. **Pediatr Res**, v. 48, n 5, p. 614-618, 2000.

MELLADO, M.; RODRIGUEZ-FRADE, J.M.; KREMER, L.; MARTINEZ-ALONSO, C. Characterization of monoclonal antibodies specific for the human growth hormone 22K and 20K isoforms. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 81, n. 4, p. 1613-1618, 1996.

MELLADO, M.; RODRIGUEZ-FRADE, M.; KREMER, L.; VON KOBBE, C.; MARTIN de ANA, A.; MÉRIDA, I.; MARTINEZ-ALONSO, C. Conformational changes required in the human growth hormone receptor for growth hormone signaling. **J Biol Chem**, v. 272, n. 14, p. 9189-9196, 1997.

MILES, L.E.M.; HALES, C.N. Immunoradiometric assay of human growth hormone. **Lancet**, v. 2, n. 566, p. 492-493, 1968.

MILLER, W. L.; EBERHARDT, N. L. Structure and evolution of growth hormone gene family. **Endocr Rev**, v. 4, n. 2, p. 97-130, 1983.

MOUTOUSSAMY, S.; KELLY, P.A.; FINIDORI, J. Growth hormone–receptor and cytokine-receptor-family signaling. **Eur J Biochem**, v. 255, n. 1, p.1-11, 1998.

NAKANE, P.K., PIERCE, G.B. Enzyme-labeled antibodies: preparation and application for localization of antigens. **J Histochem Cytochem**, v. 14 , p. 929-931, 1966.

NAKANE, P.K., KAWAOI, A. Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugation. **J Histochem Cytochem**, v.22 , p. 1084-1091, 1974.

NICOLL, C.S.; MAYER, G.L. RUSSEL, S.M. Structural features of prolactins and growth hormones that can be related to their biological properties. **Endocr Rev**, v. 7, n. 2, p. 169-203, 1986.

NIELSEN, K. Stability of freeze dried *Horseradish Peroxidase* conjugated monoclonal antibodies used in diagnostic serology. **J Immunoassay**, v. 16, n. 2, p. 183-197, 1995.

PARKS, J.S. Molecular biology of growth hormone. **Acta Paediatr Scand [Suppl]**, v. 349, p.127-135, 1989.

PRINGLE, P.L.; DI SILVIO, L.; HINDMARSH, P.C.; MATTHEWS, D.R.; KURTZ, A.B.; BROOK, C.G. Analysis of trough serum growth hormone concentrations: comparison of an immunoradiometric assay and a sensitive ELISA for growth hormone. **Clin Endocrinol (Oxf)**, v. 37, n. 2, p. 169-174, 1992.

RAKOVER, Y.; LAVI, I.; MASALAH, R.; ISSAM, T.; WEINER, E.; BEN-SHLOMO, I. Comparison between four immunoassays for growth hormone (GH) measurement as guides to clinical decisions following GH provocative tests. **J Pediatr Endocrinol Metab**, v. 13, n. 6, p. 637-643, 2000.

REUTENS, A.T.; HOFFMAN, D.M.; LEUNG, K.C.; HO, K.K. Evaluation and application of a highly sensitive assay for serum growth hormone (GH) in the study of adult GH deficiency. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 80, p. 480-485, 1995.

REUTENS, A.T.; VELDHUIS, J.D.; HOFFMAN, D.M.; LEUNG, K.C.; HO, K.K. A high sensitive growth hormone (GH) enzyme-linked immunosorbent assay uncovers increased contribution of a tonic model of GH secretion in adults with organic GH deficiency. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 81, p. 1591-1597, 1996.

RIVERO, J.L.; CASCONI, O.; BONINO, M.J.B.J. Conformational comparison in the growth hormone family. **Comp Biochem Physiol**, v. 95B, n. 2, p. 229-232, 1990.

SINHA, Y.N.; JACOBSEN, B.P. Human growth hormone (hGH)-(44-191), a reportedly diabetogenic fragment of hGH, circulates in human blood: measurement by radioimmunoassay. **J Clin Endocr Metab**, v. 78, n. 6, p. 1411-1418, 1994.

SOINI, E.; HEMMILÄ, I. Fluoroimmunoassay: present status and key problems. **Clin Chem**, v. 25, n. 3, p. 353-361, 1979.

SPENCER, S.A.; HAMMONDS, R.G.; HENZEL, W.J.; RODRIGUEZ, H.; WATERS, M.J.; WOOD, W.I. Rabbit liver growth hormone receptor and serum binding protein. Purification, characterization and sequence. **J Biol Chem**, v. 263, p. 7862-7867, 1988.

STOLAR, M.; AMBURN, K.; BAUMANN, G. Plasma "big" and "big-big" growth hormone in man: a oligomeric series composed of structurally diverse monomers. **J Clin Endocr Metab**, v. 59, p. 212-217, 1984.

STRASBURGER, C.J.; BINDER, L.; ELBERG, G.; COHEN-CHAPNIK, N.; KOHEN, F.; GERTLER, A. Indication of different lactogen and somatogen bindings sites in the human growth hormone molecule as probed with monoclonal antibodies. **Mol Cell Endocr**, v. 67, p. 55-62, 1989(a).

STRASBURGER, C.J.; KOSTYO, J.; VOGEL, T.; BARNARD, G.J.; KOHEN, F. The antigenic epitopes of human growth hormone as mapped by monoclonal antibodies. **Endocr**, v.124, p. 1548-1557, 1989(b).

STRASBURGER, C.J. Antigenic epitope mapping of the human growth hormone molecule: a strategy to standardize growth hormone immunoassays. **Acta Paediatr Scand [Suppl]**, v.370, p. 82-86, 1990.

STRASBURGER, C.J. Implications of investigating the structure-function relationship of human growth hormone in clinical diagnosis and therapy. **Horm Res**, v. 41, Supl. 2, p. 113-119, 1994.



STRASBURGER, C.J.; WU, Z.; PFLAUM, C-D.; DRESSENDÖRFER, R.A. Immunofunctional assay of human growth hormone (hGH) in serum: a possible consensus for quantitative hGH measurement. **J Clin Endocr Metab**, v. 81, n. 7, p. 2613-2620, 1996.

STRASBURGER, C.J.; DATTANI, M.T. New growth hormone assays: potential benefits. **Acta Paediatr [Suppl]**, v. 423, p. 5-11, 1997.

STRASBURGER, C.J. Laboratory assessment of GH. **Growth Horm IGF Res**, v. 8, Supl A, p. 41-46, 1998.

TAKAHASHI, H.; NABESHIMA, Y.; OGATA, K.; TAKEUCHI, S. Molecular cloning and nucleotide sequence of DNA complementary to human decidal prolactin mRNA. **J Biochem**, v. 95, n. 5, p. 1491-1499, 1984.

TAKAHASHI, Y.; SHIRONO, H.; ARISAKA, O.; TAKAHASHI, K.; YAGI, T.; KOGA, J.; KAJI, H.; OKIMURA, Y.; ABE, H.; TANAKA, T.; CHIHARA, K. Biologically inactive growth hormone caused by amino acid substitution. **J Clin Invest**, v. 100, n. 5, p. 1159-1165, 1997.

TANAKA, T.; SHIU, R.P.; GOUT, P.W. A new sensitive and specific bioassay for lactogenic hormones: measurement of prolactin and growth hormone in human serum. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 51, p. 1058-1063, 1980.

TAN-WILSON, A-L.; REICHLIN, M.; NOBLE, R.W. Isolation and characterization of low and high affinity goat antibodies direct to single antigenic sites on human hemoglobin. **Immunochemistry**, v.13, p. 921-927, 1976.

TILLMANN, V.; BUCKLER, J.M.; KIBIRIGE, M.S.; PRICE, D.A.; SHALET, S. M.; WALES, J.K.; ADDISON, M.G.; GILL, M.S.; WHATMORE, A.J.; CLAYTON, P.E. Biochemical tests in the diagnosis of childhood growth hormone deficiency. **J Clin Endocr Metab**, v.82, n. 2, p. 531-535, 1997.

TOWNS, R.; KOSTYO, J.L.; VOGEL, T.; SAKAL, E.; TCHELET, A.; MAHER, R.; GERTLER, A. Evidence that the N-terminus of human growth hormone is involved in expression of its growth promoting, diabetogenic, and insulin-like activities. **Endocrinol**, v. 130, n. 3, p.1225-1230, 1992.

TSANG, V.C.W.; WILKINS, P.P. Optimum dissociating condition for immunoaffinity and preferential isolation of antibodies with high specific activity. **J Immunol Methods**, v. 138, p. 291-296, 1991.

TSUNEKAWA, B.; WADA, M.; IKEDA, M.; BANBA, S.; KAMACHI, H.; TANAKA, E.; HONJO, M. The binding between the stem regions of human growth hormone (GH) receptor compensates for the weaker site 1 binding of 20-kDa human GH (hGH) than that of 22-kDa hGH. **J Biol Chem**, v. 275, n. 21, p. 15652-15656, 2000.

TSUSHIMA, T.; KATOH, Y.; MIYACHI, Y.; CHIHARA, K. TERAMOTO, A.; IRIE, M.; HASHIMOTO, Y. STUDY GROUP OF 20K hGH. Serum concentration of 20K human growth hormone (20K hGH) measured by a specific enzyme-linked immunosorbent assay. **J Clin Endocr Metab**, v. 84, n. 1, p. 317-322, 1999.

UNITED BIOTECH. **UBI Magiwell assays**. Ago, 1999. Product guide.

VAN REGENMORTEL, M.H.V. Solid-phase immunoassays. In: BURDON, R.H.; van KNIPPENBERG, P.H. **Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology**. Elsevier, v. 19, cap. 5, p.145-158, 1988.

VAN REGENMORTEL, M.H.V; BRIAND, J.P.; MULLER, S.; PLAUE, S. Synthetic polypeptides as antigens. In: BURDON, R.H.; van KNIPPENBERG, P.H. **Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology**. Elsevier, 227 p., 1988.

VIEIRA, J.G.; ANDO, M.H.; NISHIDA, S.K.; MACEDO, C.D.; ABUCHAM, J.Z. Clinical utility of a 22-kDa growth hormone-specific assay. **Braz J Med Biol Res**, v. 25, n. 3, p. 243-245, 1992.

WADA, M.; UCHIDA, H.; IKEDA, M.; TSUNEKAWA, B.; NAITO, N.; BANBA, S.; TANAKA, E.; HASHIMOTO, Y.; HONJO, M. The 20-kilodalton (kDa) human growth hormone (hGH) differs from the 22-kDa hGH in the complex formation with cell surface hGH receptor and hGH-binding protein circulating in human plasma. **Mol Endocr**, v. 12, p. 146-156, 1997.

WALLIS, M. The chemistry of pituitary growth hormone, prolactin, and related hormones, and its relationship to biological activity. In: WEINSTEIN, B. (Ed.) **Chemistry and biochemistry of aminoacids, peptides and proteins**. New York: Marcel Dekker, 1978. p. 213-251.

WELLS, J.A. Binding in the growth hormone receptor complex. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 93, p. 1-6, 1996.

YALOW, R.S.; BERSON, S.A. Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods. **Nature**, v. 184, p. 1648, 1959.

YOSHIZATO, H.; TANAKA, M.; FUJIKAWA, T.; HIGASHIMOTO, Y.; SHIMIZU, A.; NAKASHIMA, K. 20 kDa human growth hormone (20 K hGH) stimulates insulin-like growth factor-I (IGF-I) gene expression at lower concentrations than 22 hGH in hGH receptor-expressing Ba/F3 cells. **Endocr J [Suppl]**, v. 47, p. S37-40, 2000.

YOUNG, N.S.; CURD, J.G.; EASTLAKE, A.; FURIE, B.; SCHECHTER, A.N. Isolation of antibodies specific to sickle hemoglobin by affinity chromatography using a synthetic peptide. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 72, n. 12, p. 4759-4763, 1975.

YUKI, Y.; KATO, K. A 22 kDa human growth hormone specific enzyme-linked immunosorbent assay. **Biol Pharm Bull**, v. 17, n. 7, p. 977-979, 1994.

ZAKIN, M.M.; POSKUS, E.; LANGTON, A.A.; FERRARA, P.; SANTOME, J.A.; DELLACHA, J.M.; PALADINI, A.C. Primary structure of equine growth hormone. **Int J Pept Proteins Res**, v. 8, p. 435-444, 1976

## APÊNDICES

APÊNDICE 1 – RESULTADOS DA QUANTIFICAÇÃO DE hGH EM SORO DE 73 MENINOS OBTIDOS COM O ELISA SANDUÍCHE E COM O IRMA.....	97
APÊNDICE 2 – RESULTADOS DA QUANTIFICAÇÃO DE hGH EM SORO DE 36 MENINAS OBTIDOS COM O ELISA SANDUÍCHE E COM O IRMA.....	100

**APÊNDICE 1– RESULTADOS DA QUANTIFICAÇÃO DE hGH EM SORO DE  
73 MENINOS OBTIDOS COM O ELISA SANDUÍCHE E O  
IRMA**

APÊNDICE 1 - RESULTADOS DA QUANTIFICAÇÃO DE hGH EM SORO DE 73 MENINOS OBTIDOS  
COM O ELISA SANDUÍCHE E COM O IRMA

continua

Nome	ELISA				IRMA			
	Basal	60´	90´	120´	Basal	60´	90´	120´
AAG	0,80	1,84	15,40	6,35	0,31	1,21	16,92	4,72
AC	2,03	10,55	12,45	15,83	1,36	14,58	12,94	18,00
ALG	0,68	13,50	11,41	5,12	0,01	15,51	11,80	4,30
AVL	0,57	8,45	4,96	4,55	0,05	10,11	3,93	2,28
AJS	1,48	1,22	22,20	7,28	0,49	0,63	22,02	6,30
AAS	9,04	16,09	13,98	5,20	9,78	16,22	10,73	3,48
AS	7,56	1,18	20,98	9,26	8,00	1,80	19,95	7,71
ALBF	3,06	13,77	19,04	10,74	0,81	12,88	20,32	8,16
AVM	1,38	3,61	1,32	1,25	1,25	1,75	1,74	1,86
CEFO	2,13	19,55	22,68	14,11	1,38	30,43	29,91	14,84
CAM	1,35	16,21	8,51	3,73	0,05	16,71	7,90	1,60
CHR	0,62	0,65	7,67	7,02	0,41	0,47	13,06	9,07
CFC	0,78	1,01	13,83	14,92	0,42	0,74	13,85	12,41
CSN	1,35	26,28	53,76	31,47	0,89	28,66	47,90	32,65
DHS	1,00	1,86	9,35	6,89	0,66	2,58	10,30	7,85
DFS	3,22	1,72	10,94	9,91	2,23	0,82	8,78	10,41
DD	0,78	4,62	12,72	10,80	0,11	5,66	14,80	13,14
DPV	0,63	13,10	8,12	2,60	0,17	11,04	7,01	1,48
DP	0,67	15,73	24,52	24,00	0,32	15,79	35,46	26,71
EAP	1,30	1,27	10,02	8,79	0,68	0,78	5,76	7,12
EB	0,92	0,73	0,63	0,62	1,33	1,25	1,15	1,08
EBLS	0,78	25,87	16,09	8,84	0,37	27,42	15,76	4,58
EMEZ	2,10	8,24	6,94	3,61	0,24	7,20	4,95	1,92
EFS	0,39	0,86	0,64	0,83	1,00	1,34	1,15	0,62
EFC	1,61	1,53	0,52	0,83	0,39	0,86	0,64	0,38
EGS	0,73	0,68	9,50	13,74	0,68	0,36	10,17	15,09
ERA	1,38	1,65	2,75	2,46	0,98	1,09	1,75	1,64
FPS	0,70	4,24	2,39	1,01	0,28	4,55	2,47	0,68
FPX	0,75	1,75	1,43	0,81	0,74	1,91	1,38	0,66
FJPF	3,43	22,60	15,46	10,40	1,45	24,66	15,34	8,41
GFS	0,72	0,72	0,69	0,57	0,26	0,13	0,26	0,23
GPS	0,64	0,58	1,36	1,12	0,32	0,49	1,19	0,95
GVB	0,46	0,81	1,32	0,96	0,04	1,28	2,66	1,78
GO	2,32	3,04	26,28	12,85	2,33	2,86	30,83	15,50
HLVQ	1,11	1,12	1,37	1,20	0,69	0,74	0,94	0,81
IR	0,43	11,10	9,67	2,19	0,44	8,27	6,58	1,93
JEZ	0,53	7,12	11,52	5,15	0,13	11,1	15,47	5,18
JRM	1,11	4,76	7,15	3,51	0,32	3,34	5,74	1,86
JSB	0,78	0,57	1,45	11,98	0,26	0,20	1,35	12,87
JC	1,01	2,53	2,02	17,93	0,41	1,76	1,63	15,59
JP	1,07	1,04	6,53	14,31	0,45	1,04	7,06	11,95
LAS	1,47	10,51	13,82	10,84	0,72	10,39	13,52	7,72
LAR	0,78	11,05	13,15	6,66	0,72	10,30	13,52	7,72
LOC	0,83	6,94	8,11	7,33	0,42	12,95	14,20	8,25
LFGS	0,84	0,98	5,72	4,35	0,45	0,64	5,68	4,82
LSL	2,54	16,25	18,30	12,58	1,41	15,62	21,57	9,16
LFSP	0,67	6,73	8,97	5,56	0,05	10,53	11,17	4,81
LHLS	0,91	12,40	12,92	4,57	0,44	11,87	10,99	4,27
LRM	1,56	8,47	10,81	5,51	0,12	11,97	17,47	5,18
MDJC	0,40	8,30	7,45	2,35	0,17	9,55	7,40	1,57
MCT	0,87	12,50	6,85	1,90	0,04	6,69	3,57	4,79
MAR	4,50	4,16	6,78	6,63	4,30	4,02	7,22	7,65
MVP	0,41	0,76	17,00	18,28	0,43	0,71	18,31	14,78

APÊNDICE 1 - RESULTADOS DA QUANTIFICAÇÃO DE hGH EM SORO DE 73 MENINOS OBTIDOS COM O ELISA SANDUÍCHE E COM O IRMA

Nome	ELISA				IRMA				conclusão
	Basal	60´	90´	120´	Basal	60´	90´	120´	
MSI	0,72	31,87	12,15	5,00	0,55	35,48	14,62	4,71	
MIS	12,20	10,30	6,40	11,16	15,24	12,84	7,27	13,17	
MPM	0,44	1,63	4,73	6,31	0,48	1,50	6,91	7,86	
NRPJ	4,60	8,27	9,88	4,05	4,67	10,47	13,86	3,59	
PSTF	0,90	6,45	18,94	15,27	0,38	5,31	26,45	14,63	
PCBSS	2,24	14,82	8,47	6,24	0,85	18,14	8,52	6,73	
PHSM	2,38	25,80	16,88	9,35	1,57	27,18	13,85	7,83	
RFF	2,40	16,68	17,92	26,38	2,00	18,65	17,00	30,98	
RMO	0,51	8,69	7,45	5,23	0,24	8,89	8,60	4,71	
RSV	1,10	14,60	18,22	9,02	0,38	14,49	20,91	8,84	
RPS	2,96	1,76	1,87	1,01	2,83	0,77	2,13	0,81	
RAD	1,04	1,90	2,13	2,50	1,14	1,39	1,70	2,00	
RJSC	1,62	24,77	17,09	15,01	1,05	35,01	18,25	13,17	
RFC	0,62	0,42	3,23	4,81	0,04	0,04	2,17	4,24	
RSF	1,37	4,00	6,05	11,27	2,07	0,67	6,86	12,04	
RGF	1,11	30,93	15,44	8,37	0,05	32,15	18,38	8,11	
TCC	1,30	8,00	13,91	7,25	0,84	12,41	13,97	7,83	
THMF	0,89	12,58	11,18	2,89	0,43	6,00	10,16	2,33	
VAP	1,42	1,70	1,18	0,98	0,56	1,05	0,80	0,52	
WS	2,05	35,33	33,38	26,50	0,54	42,54	39,96	22,46	

**APÊNDICE 2 – RESULTADOS DA QUANTIFICAÇÃO DE hGH EM SORO  
DE 36 MENINAS OBTIDOS COM O ELISA SANDUÍCHE E  
COM O IRMA**



APÊNDICE 2 – RESULTADOS DA QUANTIFICAÇÃO DE hGH EM SORO DE 36 MENINAS OBTIDOS  
COM O ELISA SANDUÍCHE E COM O IRMA

Nome	ELISA				IRMA			
	Basal	60´	90´	120´	Basal	60´	90´	120´
AMP	0,85	9,72	11,82	10,89	0,01	6,61	9,48	8,60
APFFL	6,60	1,10	0,89	0,86	6,96	0,34	0,30	0,22
APF	0,69	18,61	11,59	3,96	0,37	20,68	11,64	3,42
APFS	2,66	4,18	5,15	3,29	1,35	4,14	4,49	3,37
ACAL	1,70	3,49	4,76	1,68	0,61	3,01	2,71	1,23
AF	3,95	9,52	13,6	20,05	2,91	5,44	10,47	25,00
CLB	0,46	10,27	19,07	27,70	0,56	10,72	10,66	29,50
CEVS	0,39	3,20	2,70	1,85	1,13	5,58	2,64	1,96
DAS	2,49	9,15	11,98	8,21	1,21	10,34	15,53	8,5
DAC	4,62	8,61	10,01	6,44	4,63	8,82	9,91	4,80
DCM	0,52	8,60	5,90	4,00	0,24	10,19	5,94	4,40
EPH	0,55	13,38	15,88	8,78	0,48	13,87	16,60	9,59
ECS	0,98	20,12	16,38	13,37	1,22	24,11	13,10	11,04
EPSS	8,63	5,04	34,76	23,49	8,45	3,05	31,04	26,73
FGC	0,56	1,92	4,00	5,91	0,55	0,28	2,41	4,20
FR	4,76	1,28	2,41	0,44	3,62	1,11	2,46	0,73
FR	1,01	1,15	23,52	24,02	0,1	0,46	26,60	26,74
FLS	4,10	3,48	3,48	4,10	4,48	4,62	3,71	3,74
GLB	1,60	15,35	16,72	9,09	0,45	13,56	14,87	4,98
IMMR	8,00	6,93	10,40	6,20	7,17	6,88	12,25	4,96
JSM	0,21	0,86	0,57	0,36	0,37	0,83	0,70	0,60
JASL	6,42	12,87	8,01	6,50	6,55	13,74	8,66	6,93
JS	0,41	0,62	0,49	0,70	0,22	0,31	0,45	0,70
JKSM	0,70	0,70	1,12	1,36	0,71	0,65	1,36	1,23
KSS	0,52	2,08	11,75	11,10	0,29	1,55	21,21	11,98
LTM	0,65	8,68	10,89	6,52	0,01	7,89	10,60	4,97
MP	3,58	0,92	4,75	13,83	5,96	0,72	4,05	13,57
PP	5,54	1,25	4,33	15,75	4,61	0,84	1,83	14,84
RLS	0,78	1,14	4,23	4,91	0,15	0,28	5,23	6,91
RFA	0,96	20,31	17,98	7,36	0,29	23,62	19,42	9,07
RMME	1,20	4,00	4,97	5,12	0,01	2,05	3,63	4,35
RPC	0,40	0,38	0,80	10,52	0,22	0,31	0,53	9,48
SES	0,53	0,96	12,49	7,71	0,41	1,21	11,45	8,02
TR	0,85	12,15	7,87	2,87	0,16	12,38	7,24	1,87
TS	3,20	19,63	9,63	3,98	3,27	16,67	11,42	4,34
VCL	0,72	35,10	21,57	9,36	0,36	35,49	22,44	8,47

## **ANEXO**

ANEXO 1 - CARTA DA COMISSÃO DE ÉTICA.....	103
-------------------------------------------	-----

Curitiba, 26 de abril de 2.001.

Ilmo (a) (s) Sr. (a) (s)  
Dra. Juliana Ferreira de Moura

Nesta

Prezado(a) Senhor(a):

Comunicamos que o Projeto " **DESENVOLVIMENTO DE ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO PARA DETERMINAÇÃO DO HORMÔNIO DE CRESCIMENTO HUMANO**", está de acordo com as normas éticas estabelecidas pela Resolução nº 196/96 do Ministério da Saúde.

**Protocolo CEP-HC nº 311.021/2001-03**

O referido projeto foi apresentado ao Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, em reunião realizada no dia 24 de abril de 2.001.

Sendo o que se apresenta para o momento, subscrevo-me,

Atenciosamente

  
**Prof. Dr. Renato Tambara Filho**

Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa em  
Serres Humanos do Hospital de Clinicas – UFPR